Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Das Verteilungsmuster der Isoenzyme der Lactatdehydrogenase im Serum von Patienten mit akuter Paraleukoblastose. Ein Beitrag zur Klärung seiner Entstehung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eberhard Kurrle
aus Biberach a. d. Riß

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0014

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Das Verteilungsmuster der Isoenzyme der Lactatdehydrogenase im Serum von Patienten mit akuter Paraleukoblastose. Ein Beitrag zur Klärung seiner Entstehung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eberhard Kurrle
aus Biberach a. d. Riß

1970

Dekan: Professor Dr. Dr. K. Mayer

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. H.E. Bock
2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Klaus

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungen 1

A. Einleitung

1. Die Lactatdehydrogenase und ihre Isoenzyme - Geschichte und Nomenklatur 2
2. Eigenschaften, Struktur und biologische Bedeutung der Isoenzyme der LDH 3
3. Verteilung der Isoenzyme der LDH in den Geweben 6
4. Die Bedeutung der LDH und ihrer Isoenzyme für die klinische Diagnostik, insbesondere für die Diagnose von Malignomen 7
5. Problemstellung der Arbeit 9

B. Methodik

I. Beschreibung der angewandten Methoden

1. Gewinnung von Serum 10
2. Isolierung von Leukozyten 10
3. Zytolyse von Leukozyten 11
4. Inkubation von Leukozyten 11
5. Messung der LDH-Aktivität 12
6. Bestimmung der relativen Verteilung der Isoenzyme der LDH 12

II. Untersuchungen zur Methodik der Bestimmung der relativen Verteilung der Isoenzyme der LDH

1. Reproduzierbarkeit 16
2. Methoden zur Bestimmung der Verteilung der LDH-Isoenzyme durch Elution aus Agargel und direkte Aktivitätsmessung und zur Gewinnung isolierter Isoenzymfraktionen 17

Seite

3. Untersuchungen über die Färbeaktivität der Isoenzyme LDH-I und LDH-V 19
4. Einfluß der Färbedauer auf die Darstellung von Isoenzymfraktionen der LDH 21
5. Einfluß der zur Elektrophorese aufgetragenen Enzymaktivität der LDH auf die Ermittlung ihrer Isoenzymverteilung 26
6. Die Bedeutung der "nothing dehydrogenase" als Fehlerquelle für die Bestimmung der Verteilung der Isoenzyme der LDH des Blutserums 31
7. Zusammenfassung 34

C. Ergebnisse der Untersuchungen über die Entstehung des tumorspezifischen Verteilungsmusters der Isoenzyme der LDH im Serum von Patienten mit akuter Leukose
1. Vergleich der Isoenzymverteilungsmuster der LDH im Serum und in Paraleukoblasten bei Patienten mit akuter Paraleukoblastose 35
2. Abgabe von LDH-Isoenzymen an das Inkubationsmedium durch inkubierte Paraleukoblasten 43
3. Ausschluß selektiver Inaktivierung von LDH-Isoenzymen durch Serumbestandteile .. 45
4. Ausschluß bestimmter anderer Herkunftsorte der erhöhten SLDH-Aktivität der untersuchten Patienten 46
5. Untersuchungen über den Abfall erhöhter SLDH-Aktivitäten nach Myocardinfarkten und akuten Leberparenchymschäden 49

D. Diskussion der Ergebnisse
1. Zum Serummuster der LDH-Isoenzyme bei akuten Paraleukoblastosen 53

Seite

2. Zum Verteilungsmuster der Isoenzyme der LDH in Paraleukoblasten 54
3. Zu dem Ergebnis der Inkubationsversuche 55
4. Zur Frage unterschiedlicher Eliminationsgeschwindigkeiten der LDH-Isoenzyme aus dem Blutserum beim Menschen 55
5. Abschließende Betrachtung über die Entstehung des tumorspezifischen Verteilungsmusters der Isoenzyme der SLDH bei Patienten mit akuter Paraleukoblastose ... 58

E. Zusammenfassung 66

Anhang: Tabellen zur Statistik 69

F. Literaturverzeichnis 74

Abkürzungen

g	=	Erdbeschleunigung (= 9,81 m/sec^2)
h	=	Stunde
IE	=	Internationale Einheit
LDH	=	Lactatdehydrogenase
m	=	Meter
M	=	Mol
mg	=	Milligramm
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimol
mU	=	Millieinheit = 10^{-3} IE
NAD^+	=	Nicotinamidadenindinucleotid
$NADH + H^+$	=	reduziertes NAD^+
nm	=	Nanometer
RES	=	Reticuloendotheliales System
sec	=	Sekunde
SGOT	=	Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
SGPT	=	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase
SLDH	=	Serum-Lactatdehydrogenase
U/min	=	Umdrehungen pro Minute

A. Einleitung

1. Die Lactatdehydrogenase und ihre Isoenzyme - Geschichte und Nomenklatur.

Das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH; L-Lactat: NAD Oxidoreductase, E. C. 1. 1. 1. 27) (76) katalysiert,wie WARBURG und CHRISTIAN zeigen konnten, folgende Reaktion:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Lactat} + \text{NAD}^+ \qquad (90)$$

Die reine kristalline Darstellung der LDH gelang erstmals STRAUB (84) aus Rinderherz. Im Jahre 1950 trennte MEISTER (58) die nach dem Straub'schen Verfahren gewonnene kristalline LDH mit Hilfe der freien Elektrophorese nach Tiselius in zwei Fraktionen auf. Diese Entdeckung wurde von NEILANDS (62, 63) bestätigt, der darüber hinaus nachweisen konnte, daß die beiden Fraktionen unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Aber erst nach Einführung trägerelektrophoretischer Methoden konnten WIELAND et al. (94) und PFLEIDERER et al. (66,67) in ihren Untersuchungen zeigen, daß sich die LDH der Gewebe von Tier und Mensch in jeweils fünf verschiedene Fraktionen auftrennen läßt.

Einem Vorschlag des Standing Committee on Enzymes (Subcommittee on Isoenzymes) of the International Union of Biochemistry folgend sollen multiple Formen eines Enzymes bei einer Spezies, wie sie bei der LDH beobachtet werden, als Isoenzyme bezeichnet werden (91). Dieselbe Kommission empfiehlt, die Isoenzyme entsprechend ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit zu numerieren. Die Zählung soll mit dem am schnellsten anodisch wandernden Isoenzym beginnen (91); dieses wird bei der LDH demnach als LDH-I bezeichnet (siehe Abb. 1).

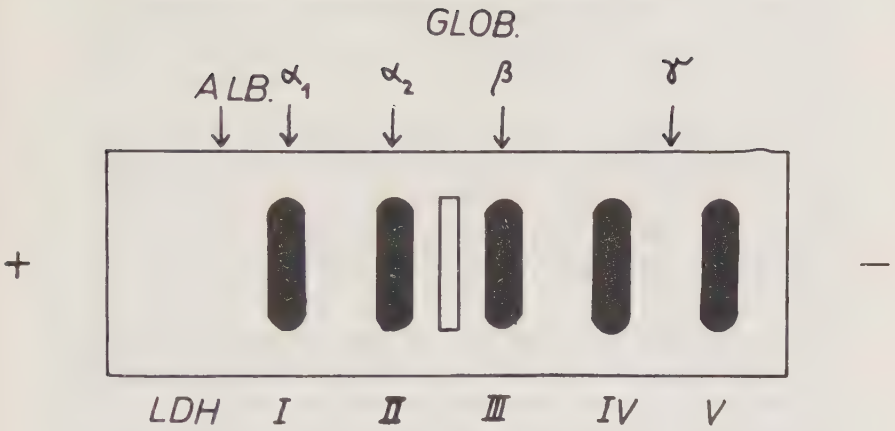

Abb. 1: Lage der LDH-Isoenzyme nach Elektrophorese im Agargel bei pH 8.4. Die Lage der Serumproteine ist durch Pfeile markiert.

2. Eigenschaften, Struktur und biologische Bedeutung der Isoenzyme der LDH.

Molekulargewicht: Die Isoenzyme der LDH haben beim Rind ein Molekulargewicht von 135 000 (6). Nach RAYMOND et al. (73) haben alle Isoenzyme der menschlichen LDH dasselbe Molekulargewicht.

Aminosäurenzusammensetzung: WACHSMUTH et al. (87) analysierten die Aminosäurenzusammensetzungen der einzelnen LDH-Isoenzyme des Menschen und stellten fest, daß der Gehalt an Aminosäuren mit sauren Gruppen wie Glu und Asp von der LDH-I zur LDH-V kontinuierlich abfällt, während umgekehrt der Gehalt an Arg, Gly, Tyr und Phe ansteigt. Aus diesen Befunden lassen sich die Unterschiede

der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Isoenzyme gut erklären.

Ergebnisse über Sequenzanalysen liegen bis jetzt nicht vor.

Tetramer-Theorie: Nach Untersuchungen von APPELLA und MARKERT (6, 57) ist jedes LDH-Isoenzym ein Tetramer und kann durch Einwirkung bestimmter Lösungen, z. B. 1 M NaCl-Lösung, in je vier Monomere mit einem Molekulargewicht von 34 000 zerlegt werden. Nach Verdünnung der NaCl-Lösung tritt eine Rekombination der Monomere zu Tetrameren nach den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit ein. So gelingt es, aus einer Mischung der Monomere von LDH-I und LDH-V alle fünf Isoenzyme zu synthetisieren. Bezeichnet man die Monomere der LDH-I als H (=heart) und der LDH-V als M (=muscle), so kommt den einzelnen Isoenzymen folgende Konstitution zu: LDH-I = H_4, LDH-II = H_3M_1, LDH-III = H_2M_2, LDH-IV = H_1M_3 und LDH-V = M_4.
Diese Tetramer-Theorie wird durch Untersuchungen von CAHN et al. (17) gestützt, die zeigen konnten, daß gegen die Isoenzyme LDH-I und LDH-V des Kaninchen sich spezifische Antikörper herstellen lassen, die eine immunologische Unterscheidung dieser beiden Isoenzyme ermöglichen und auch mit den drei übrigen Isoenzymen reagieren, ohne hier jedoch eine bestimmte Spezifität aufzuweisen.

Nach diesen Ergebnissen muß angenommen werden, daß die Synthese der beiden Monomere H und M unter der Kontrolle zweier Gene steht, und die Kombination zu den Tetrameren nach den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit erfolgt, d. h. die Produktion der fünf Isoenzyme in der Zelle durch zwei Gene gesteuert wird (17).

Substratoptima für Pyruvat: Wie PLAGEMAN et al. (69) nachwiesen, haben die einzelnen LDH-Isoenzyme unterschiedliche Substratoptima für Pyruvat, und zwar nimmt die optimale Pyruvatkonzentration von der LDH-I zur LDH-V

kontinuierlich von 0,15 x 10^{-3} M/l bis 1,2 x 10^{-3} M/l zu. Werden die optimalen Werte unter- oder überschritten, tritt eine Hemmung der Aktivität der betroffenen Isoenzyme ein.

Bei einer Pyruvatkonzentration von 0,4 x 10^{-3} M/l beträgt für alle Isoenzyme der Aktivitätsverlust 10%, so daß zu einem relativen Vergleich der Aktivitäten reiner Isoenzymfraktionen nicht jede Fraktion mit ihrem individuellen Substratoptimum im optischen Test bestimmt werden muß (69).

Eliminationsgeschwindigkeiten der LDH-Isoenzyme aus dem Blutserum: Untersuchungen von MAHEY et al. (56) und BOYD (14) haben ergeben, daß die Halbwertzeiten intravenös zugeführter LDH-Isoenzyme im Blutserum bei Mäusen und Schafen sehr unterschiedlich sind, und zwar wird regelmäßig das Isoenzym LDH-I am langsamsten und das Isoenzym LDH-V am schnellsten eliminiert. Die übrigen Isoenzyme nehmen entsprechend ihrer Zusammensetzung aus den Monomeren eine Mittelstellung ein. Beim Schaf soll das Isoenzym LDH-V 7,5 bis 15 mal rascher aus dem Blutserum eliminiert werden als das Isoenzym LDH-I.

Weitere unterschiedliche Eigenschaften der LDH-Isoenzyme: Die LDH-Isoenzyme unterscheiden sich ferner in ihrer Hitzebeständigkeit (70, 108), Kälteempfindlichkeit (47) und in ihrer Hemmbarkeit durch Harnstoff und andere Substanzen(78, 102). Hierbei nimmt die Empfindlichkeit von der LDH-I zur LDH-V kontinuierlich zu, was als indirekter Beweis für die Richtigkeit der Tetramer-Theorie gewertet werden kann.

Stoffwechselbedeutung der LDH-Isoenzyme: Die Bedeutung des Vorkommens der Isoenzyme der Lactatdehydrogenase für den Stoffwechsel ist auch heute noch nicht völlig geklärt. Nach einer Hypothese von CAHN et al. (17) ist der entscheidende Faktor ihre unterschiedliche Hemmbarkeit durch Pyruvat: Gewebe mit aerobem Stoffwechsel (z.B. Herzmuskulatur) enthalten überwiegend LDH-I, also das

Isoenzym, dessen Aktivität bereits durch relativ geringe Pyruvatkonzentrationen gehemmt wird. Somit wird in Geweben, die mit diesem Isoenzym ausgestattet sind, bei Anfall größerer Mengen von Brenztraubensäure die Anhäufung von Milchsäure und die damit verbundene Ansäuerung verhindert, und der oxydative Abbau des Pyruvats über den Zitronensäurenzyklus erzwungen. Gewebe, die ihren Energiebedarf auch unter anaeroben Bedingungen decken müssen (z. B. Skelettmuskulatur) enthalten hingegen die LDH-V. Dieses Isoenzym katalysiert auch bei höheren Konzentrationen von Pyruvat die Bildung von Lactat und fördert dadurch die anaerobe Glykolyse.

3. Verteilung der Isoenzyme der LDH in den Geweben.

Untersuchungen von PFLEIDERER et al. (68) haben gezeigt, daß die einzelnen Organe und Gewebe des Menschen recht unterschiedlich mit den fünf LDH-Isoenzymen ausgestattet sind. Zwar gibt es kein Isoenzym, das für ein bestimmtes Organ spezifisch ist, doch treten organcharakteristische Isoenzymverteilungsmuster auf. Nach PFLEIDERER et al. (68) kann man drei grundsätzlich verschiedene Verteilungstypen unterscheiden:

Typ I (Überwiegen von LDH-I und LDH-II): Herz, Erythrozyten, Hirn, Niere.
Typ II (Überwiegen von LDH-II, LDH-III und LDH-IV): glatte Muskulatur, Hoden, Ovar, Knorpel, Lunge, Milz, Schilddrüse, Prostata.
Typ III (Überwiegen von LDH-V): Leber, Skelettmuskulatur, Epidermis.

In Tumoren treten häufig vom Ausgangsgewebe abweichende Verteilungsmuster der LDH-Isoenzyme auf. Es gibt jedoch kein Verteilungsmuster, das spezifisch für Malignomgewebe ist. PFLEIDERER et al. (67, 68), GOLDMAN et al. (31, 32) und andere Autoren (30, 72, 77) beobachteten bei einer Vielzahl maligner Neoplasmen eine Verschieb-

ung des Aktivitätsmaximums nach den Fraktionen LDH-IV und LDH-V. BOTTOMLEY et al. (12) und STARKWEATHER et al. (83) fanden hingegen auch Tumoren mit einem Aktivitätsmaximum in der Fraktion LDH-III. Nach DIOGUARDI et al. (20) und weiteren Autoren (5, 31, 45, 83, 104) weisen leukämische Leukozyten denselben Verteilungstyp auf. In Seminomen und Dysgerminomen von Hoden und Ovar stellte ZONDAG (114) eine Dominanz der Isoenzyme LDH-I und LDH-II fest.

Die vielfältigen erhobenen Befunde wurden von den einzelnen Autoren sowohl im Sinne einer Entdifferenzierung der Malignomzellen (83) als auch im Sinne einer Verschiebung der Stoffwechsellage dieser Zellen zum anaeroben Typus hin (67) interpretiert.

4. Die Bedeutung der LDH und ihrer Isoenzyme für die klinische Diagnostik, insbesondere für die Diagnose von Malignomen.

Die Bestimmung der Aktivität der Serum-LDH (SLDH) ist für die klinische Diagnostik bedeutungsvoll, da bei vielen Erkrankungen Aktivitätserhöhungen dieses Enzymes auftreten, so bei Myocardinfarkten (43, 107, 112), Hämolysen (33, 112), perniziöser Anämie (3, 33, 37, 53), Lebererkrankungen (42, 43, 81, 112), infektiöser Mononukleose (43, 112), malignen Tumoren (9, 10, 15, 40, 50, 53, 59, 82, 93, 112) und Leukämien (9, 10, 11, 37, 43, 46, 54, 75, 92, 107).

Aus diesen Befunden geht hervor, daß ein Anstieg der Aktivität der SLDH nicht spezifisch für eine bestimmte Erkrankung ist und daher isoliert betrachtet oft nur geringen differentialdiagnostischen Wert besitzt. Mit Hilfe der Bestimmung der relativen Verteilung der Isoenzyme der LDH im Serum ist es jedoch möglich festzustellen, auf welche der fünf Fraktionen die Erhöhung des Gesamtenzymes zurückzuführen ist. Derartige Unter-

suchungen, die erstmals von VESELL und BEARN (86) und HESS (38) vorgenommen wurden, ergaben, daß der Bestimmung der Isoenzymverteilung der SLDH eine weit höhere Aussagekraft zukommt als der alleinigen Aktivitätsmessung der SLDH.

Entsprechend der Einteilung der Gewebe nach ihrer LDH-Isoenzymzusammensetzung (68) kann man auch im Serum bei erhöhter Gesamtlactatdehydrogenaseaktivität drei pathologische Verteilungsmuster der LDH-Isoenzyme unterscheiden, die hier nach FRÖHLICH (29) als Typ A, B und C bezeichnet werden:

Typ A: Die Erhöhung des Gesamtenzymes wird durch Anstieg der Isoenzyme LDH-I und LDH-II hervorgerufen. Dieser Verteilungstyp tritt bei Myocardschäden (18, 109), Hämolysen (103), perniziöser Anämie (18) und schweren akuten Nierenparenchymschäden (85) auf.
Typ B: Die SLDH-Erhöhung kommt durch Vermehrung der LDH-V zustande. Dies ist der Fall bei Lebererkrankungen (98, 103).
Typ C: Der Anstieg der LDH im Serum geht auf eine Aktivitätssteigerung der Fraktionen LDH-II, LDH-III und LDH-IV zurück. Dabei sind die Fraktionen LDH-III und LDH-IV relativ erhöht, während die prozentualen Anteile der LDH-I und LDH-V an der Gesamtaktivität erniedrigt sind. Die relative Stärke der LDH-II ist meist nur wenig verändert. Dieses Muster soll nach neueren Untersuchungen von WÜST et al. (109, 110), ZONDAG (114, 115), FRÖHLICH (29) und LEHMANN et al. (49) nahezu spezifisch für das Vorliegen eines Malignoms (Tumor oder Leukämie) sein. Dieser Typ C wurde aber auch bei infektiöser Mononukleose (29, 114), Typhus, Coli-Sepsis und ausgedehnten Gewebsnekrosen (114) gefunden. Da diese Erkrankungen meist leicht abgegrenzt werden können, ist der Verteilungstyp C ein sehr spezifischer Hinweis auf das Vorliegen eines Malignoms.

5. Problemstellung der Arbeit.

Die Entstehung des beschriebenen Verteilungsmusters der LDH-Isoenzyme, welches bevorzugt bei Tumorerkrankungen und Leukämien auftritt, ist noch weitgehend ungeklärt. Für die einfache Annahme, daß es durch Überlagerung des normalen Serummusters durch zusätzlich aus Tumorzellen abgegebene LDH-Isoenzyme zustande kommt, gibt es keine Anhaltspunkte: die in Tumorzellen und leukämischen Leukozyten beobachteten Verteilungstypen stimmen mit dem im Serum von Malignomkranken gefundenen LDH-Isoenzymmuster nicht überein (13, 29), ohne daß hierfür eine Erklärung gegeben werden kann.

In diesem Zusammenhang verdient die Beobachtung, daß bei verschiedenen Tierspezies die einzelnen Isoenzyme der LDH unterschiedlich rasch aus dem Blutserum eliminiert werden (14, 56), besonderes Interesse, eröffnet sich doch hier eine Erklärungsmöglichkeit für die fehlende Übereinstimmung der LDH-Isoenzymmuster in Tumorzellen und Serum von Malignomträgern.

Da zu diesem Problem noch keine weiterreichenden Untersuchungen vorliegen, soll in dieser Arbeit versucht werden, ein Beitrag zur Klärung der Entstehung des tumorspezifischen Verteilungstypes der LDH-Isoenzyme im Serum zu leisten. Dabei soll die besondere Fragestellung berücksichtigt werden, ob auch beim Menschen unterschiedliche Eliminationsgeschwindigkeiten der einzelnen LDH-Isoenzyme angenommen werden können, und wie sich diese gegebenenfalls auf ein aus Tumorzellen abgegebenes LDH-Isoenzymmuster auswirken.

B. Methodik.

I. Beschreibung der angewandten Methoden.

1. Gewinnung von Serum.

Das von nüchternen Patienten gewonnene Blut wurde sofort nach der Gerinnung 5 min bei 5 000 U/min zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde dekantiert und bis zur Messung der Aktivität der LDH und Bestimmung der Verteilung der LDH-Isoenzyme, welche am selben Tag erfolgten, bei 4°C aufbewahrt.

2. Isolierung von Leukozyten.

Die Isolierung von Leukozyten aus Patientenblut erfolgte nach der Methode von LÖHR und WALLER (52): 18 ml Blut wurden in ein siliconisiertes Reagenzglas abgenommen, das 2 ml einer 5%-igen Lösung des Dikalium-Magnesium-Salzes der Äthylendiamintetraessigsäure[1)] als gerinnungshemmenden Zusatz enthielt. Im Wasserbad bei 37°C sedimentierten die Erythrozyten innerhalb von 30 min,und die Leukozytenschicht konnte mit einer siliconisierten Pipette abgehebert werden. Serum und Leukozyten wurden durch Zentrifugieren in einer Kühlzentrifuge (4°C) bei 120 g in fünf Minuten getrennt. Restliche Erythrozyten im Sediment wurden durch 3 ml einer 0,83%-igen NH_4Cl-Lösung hämolysiert, die nach 3 min Stehenlassen abzentrifugiert wurde (5 min bei 400g). Anschließend wurden die Leukozyten dreimal in einer Glucose-Ringer-Phosphatpuffer-Lösung folgender Zusammensetzung gewaschen:

45 ml Ringer-Lösung

NaCl	6,2 g
KCl	0,2 g

1) Magnesium-Titriplex^R; Fa. Merck, Darmstadt

$MgCl_2$	0,1 g
$NaHCO_3$	2,0 g
Aqua dest. ad	1 000,0 ml

5 ml 1/15 M K-Phosphatpuffer pH 7.4

1/15 M K_2HPO_4	80,8 ml
1/15 M KH_2PO_4	19,2 ml

100 mg D-Glucose

Es wurde jeweils 5 min bei 400 g abzentrifugiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der letzten Waschaufschwemmung. Während des Waschvorganges verloren die Leukozyten keine meßbaren LDH-Aktivitäten an die Waschlösung.

3. Zytolyse der Leukozyten.

Die isolierten Leukozyten wurden durch Zugabe einer 0,001 M Phosphatpufferlösung pH 7.4 zum Sediment der letzten Waschung zytolysiert. Nach 60 min wurde hochtourig abzentrifugiert (30 min). Die Enzyme (LDH und ihre Isoenzyme) wurden im Überstand bestimmt.

Die so gewonnenen Ergebnisse stimmten mit den Resultaten, die nach Zytolyse durch mechanische Zerkleinerung (Ultra Turrax, Fa. Jahnke & Kunkel) und Ultraschall erhalten wurden (Ultra Sonics Desintegrator MSE, Modell 3000, 1,7 Amp.), voll überein. Erstere Methode wurde wegen ihrer Einfachheit vorgezogen.

4. Inkubation von Leukozyten.

Die Inkubation von Leukozyten erfolgte nach der von ENGELHARDT et al. (24, 25, 26) angegebenen Methode: isolierte Leukozyten wurden in der beschriebenen Glucose-Ringer-Phosphatpuffer-Lösung aufgeschwemmt und in einem nicht benetzbaren Gefäß bei 37°C inkubiert (Konzentration: ca. 50 000 Leukozyten/mm^3). Nach Beendigung der Inkubation wurden Leukozyten und Inkubationsmedium durch Zentrifugieren getrennt (5 min bei 5 000 U/min).

5. Messung der LDH-Aktivität.

Die Bestimmung der Aktivität der LDH in Serum und Leukozyten-Zytolysat erfolgte nach der Methode von KUBOWITZ und OTT (8, 48). Die Pyruvatkonzentration im Reaktionsansatz betrug, sofern nichts anderes vermerkt, 0,3 mM/l. Die Messung der Extinktionsabnahme erfolgte im Photometer Eppendorf bei 334 nm bei einer Temperatur von 25°C. Die Aktivitätsangabe erfolgt in mU/ml. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

6. Bestimmung der relativen Verteilung der Isoenzyme der LDH.

a.) Elektrophorese: Die fünf Isoenzyme der LDH wurden elektrophoretisch in Agargel nach der Methode von WIEME et al. (95, 96, 97, 100) in einer Modifikation nach (28) mit Hilfe der Agargelelektrophoreseapparatur der Fa. LKB (Stockholm, Schweden) aufgetrennt: die mikroskopischen Objektträger wurden zu je drei hintereinander in Plastikrahmen (Fa. LKB, Stockholm) eingelegt, in die dann die heiße Lösung des Agargeles (1% Agar[1]) in 0,1 M Na-Barbitalpuffer pH 8.4) gegossen wurde (12 ml für je drei Objektträger). Mit Hilfe einer heißen Platinklinge oder durch Austrocknung mit Filterpapierstreifen wurde über jedem Objektträger ein Graben von 1,5 cm Länge senkrecht zur Elektrophoreserichtung in das erstarrte Gel gezogen, in den die zu untersuchende Flüssigkeit (0,05 bis 0,07 ml) mit Hilfe einer feinen Glaspipette eingebracht wurde. Die Elektrophorese wurde im Kühlraum bei einer Temperatur von +4°C und einer Potentialdifferenz von 220 V durchgeführt. Als Elektrodenpuffer diente 0,1 M Na-Barbitalpuffer pH 8.4. Die Elektrophoresedauer betrug 3 1/2 h. Anschließend wurden die Gräben mit verflüssigtem Agargel wieder aufgefüllt. Es wurde darauf geachtet, daß die zur Elektro-

1) Special Agar-Noble, Difco Laboratories, Detroit, USA.

phorese aufgetragene Gesamtaktivität der LDH 40 mU nicht überstieg (ausgenommen methodische Untersuchungen).

b.) Färbung: Die elektrophoretisch aufgetrennten LDH-Isoenzyme wurden durch histochemische Färbung nach van der HELM (35, 36) und WIEME et al. (99) in einer etwas modifizierten Methode (28) dargestellt. Die Färbung erfolgte unter Lichtabschluß im Wärmeschrank bei 37°C und dauerte 85 min. Die Färbelösung hatte folgende Zusammensetzung:

0,5 M Na-Lactat	15 ml
0,1 M Phosphatpuffer pH 6.0	25 ml
Aqua dest.	110 ml
0,05 M $MgCl_2$	1,5 ml
Phenazin Methosulfat[1)]	30 mg
p-Nitro-blautetrazoliumchlorid[1)]	75 mg
NAD[2)]	50 mg
0,1 M NaCN	15 ml

Bei dem Färbevorgang laufen folgende Reaktionen ab (101, 115): die LDH oxydiert Lactat zu Pyruvat, das durch Cyanid in eine Cyanhydrinverbindung überführt wird, um die LDH nicht zu hemmen. Der bei der Oxydation frei werdende Wasserstoff wird über NAD und Phenazin-Methosulfat als Redoxkatalysatoren auf das Tetrazoliumsalz übertragen, das hierdurch in unlösliches Formazan überführt wird, welches an den Orten der LDH-Aktivität als rötlich-violette Banden ausfällt(siehe Abb. 2).

c.) Fixation und Trocknung: Nach der Färbung wurden die Präparate in einem Gemisch aus Essigsäure:Methanol:Aqua dest. = 1:5:5 ca. 24 h fixiert und von überschüssiger Färbelösung befreit. Anschließend wurden sie im Wärmeschrank bei 40°C getrocknet. Nach der Trocknung erscheint das Gel als dünner durchsichtiger Film, der

1) Fa. Serva, Heidelberg
2) Fa. Boehringer, Mannheim

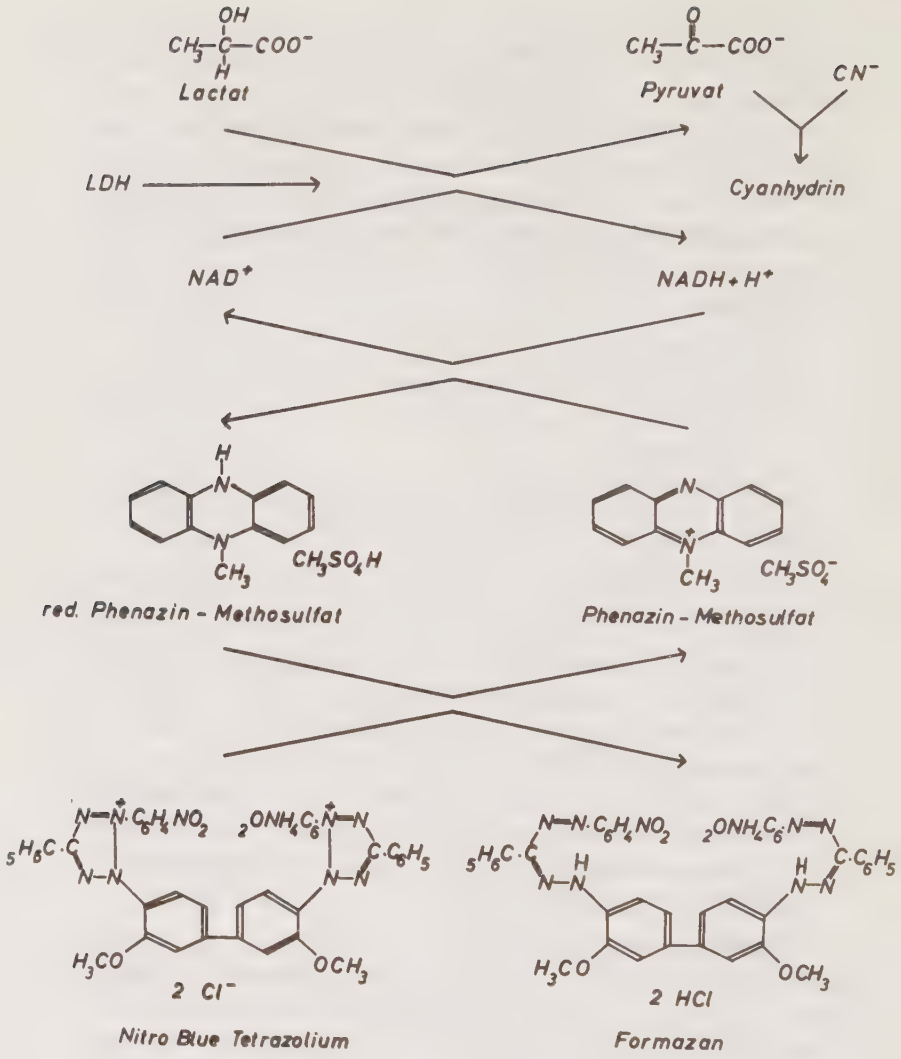

Abb. 2: Reaktionsschema der histochemischen Färbung zur Darstellung von LDH-Aktivität. Modifiziertes und erweitertes Schema nach (101, 115).

fest auf den Objektträgern haftet.

d.) Auswertung: Die fertigen Präparate wurden in einem Extinktions-Integralschreiber (Fa. Zeiss) ausgewertet. Die Angabe der Stärke der einzelnen Isoenzymfraktionen erfolgt in Prozent der Gesamtaktivität. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

II. Untersuchungen zur Methodik der Bestimmung der relativen Verteilung der Isoenzyme der LDH.

Die Untersuchungen zur Methodik der Bestimmung der relativen Verteilung der fünf LDH-Isoenzyme mit Hilfe des beschriebenen Färbeverfahrens sollten klären, welche Reproduzierbarkeit die Methode besitzt, ob sich die einzelnen Isoenzyme in ihrer Aktivität der Farbstoffbildung unterscheiden, und wie die zeitliche Dauer der Färbung und die Größe der zur Elektrophorese aufgetragenen Enzymaktivität das Resultat beeinflussen.

1. Reproduzierbarkeit.

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch 27-fache Bestimmung der Verteilung der LDH-Isoenzyme in einem Leukozyten-Zytolysat (einer chronischen Myelose) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

	LDH-I	LDH-II	LDH-III	LDH-IV	LDH-V
$\bar{x}$ [1]	5,1%	23,5%	31,6%	18,2%	21,6%
s [2]	0,5	1,4	0,8	0,3	1,7
V_K [3]	8,8	6,0	2,6	1,7	8,0

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \qquad V_K = \frac{s \times 100}{\bar{x}}$$

Tab. 1: Reproduzierbarkeit der angewandten Methode zur Bestimmung der relativen Verteilung der LDH-Isoenzyme. Aufgetrenntes Material: Zytolysat aus Leukozyten einer chronischen Myelose (n = 27).

1) $\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert
2) s = Standardabweichung
3) V_K = Variationskoeffizient

Unter den gewählten Bedingungen (hohe Ausgangsaktivität, gleichmäßige Verteilung der fünf Fraktionen) zeigt die angewandte Methode eine gute Reproduzierbarkeit. Die Variationsbreite der Einzelbestimmung liegt unter ± 10%, wobei eine gewisse Abhängigkeit des Variationskoeffizienten von der relativen Stärke der Einzelfraktion zu erkennen ist.

2. Methoden zur Bestimmung der Verteilung der LDH-Isoenzyme durch Elution aus Agargel und direkte Aktivitätsmessung und zur Gewinnung isolierter Isoenzymfraktionen.

Aus der einleitend angeführten Fragestellung ergab sich die Notwendigkeit, eine Methode zur Bestimmung der Verteilung der Isoenzyme der LDH im Agargel zu entwickeln, die auf einer direkten Messung der Enzymaktivität im optischen Test beruht, um die mit der Färbemethode erhaltenen Ergebnisse auf systematische Fehler überprüfen zu können.

Mit einer definierten Menge Untersuchungsmaterial bekannter LDH-Aktivität wurde eine normale Agargelelektrophorese durchgeführt. Dann wurde von zwei Objektträgern, die während der Elektrophorese parallel zueinander gelegen waren, einer gefärbt. Mit Hilfe des gefärbten Präparates wurden die einzelnen Isoenzymfraktionen auf dem ungefärbten Objektträger lokalisiert, als 1,2 cm breite Streifen aus dem Gel herausgeschnitten und einzeln in 1/20 M Phosphatpuffer pH 7.5 in einem Glashomogenisator nach Potter-Elvehjem (Fa. Braun-Melsungen) unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenisat wurde in graduierten Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert, und nach Ablesung des Gesamtvolumens von Agargelsediment und Überstand wurde im letzteren die LDH-Aktivität im optischen Test (8, 48) bei einer Pyruvatkonzentration von $0{,}4 \times 10^{-3}$ M/l bestimmt, bei welcher alle LDH-Isoenzyme einen Aktivitätsverlust von 10% aufweisen (69). So wurde ein exakter relativer Vergleich der gemessenen Enzymaktivitäten ermöglicht. Die Reinheit

der auf diese Weise gewonnenen Isoenzymfraktionen wurde durch Reelektrophorese kontrolliert.

Die Berechnung der Aktivität A eines Isoenzymes erfolgte nach der Formel A = c x V (A = Aktivität in mU, c= Aktivität im Überstand in mU/ml, V = Volumen von Sediment + Überstand in ml). Dann wurde der prozentuale Anteil der Aktivität eines Isoenzymes an der Gesamtaktivität aller Isoenzyme ermittelt. Die gute Reproduzierbarkeit dieser Methode zeigt Tabelle 2. Die Ausbeute der aufgetragenen Aktivität war ziemlich konstant und betrug im Mittel 74,7% (72,5%– 76,5%).

		LDH-				
Nr.	Ausbeute	I	II	III	IV	V
1	73,5%	4,2	7,5	14,1	10,1	64,1
2	76,5%	4,0	8,0	13,1	10,0	64,9
3	74,5%	3,5	8,6	13,0	12,7	62,2
4	72,5%	4,3	8,5	13,9	10,2	63,1
5	76,5%	4,3	8,5	13,3	9,9	64,0
$\bar{x}$	74,7%	4,1	8,2	13,5	10,5	63,7
s	1,8	0,3	0,5	0,5	1,1	1,1
V_K	2,4	7,3	6,1	3,7	10,4	1,7

Tab.2: Reproduzierbarkeit der Methode zur Bestimmung der Verteilung der LDH-Isoenzyme im Agargel durch Elution und Messung der Enzymaktivität im optischen Test. Ergebnisse von fünf Bestimmungen der Isoenzymverteilung desselben Materials (Skelettmuskulatur). Angabe der Fraktionstärke in Relativprozent.

Die Frage, ob der Berechnung der Aktivität eines Isoenzyms das Gesamtvolumen von Sediment aus homogenisiertem Agargel und Überstand zugrunde gelegt werden darf, d. h. in wieweit das Sediment lösender Raum für die LDH darstellt, wurde durch die Bestimmung des LDH lösenden Raumes nach dem Verdünnungsprinzip geklärt.

Zu 2,9 ml eines Agargelhomogenisates wurden 0,1 ml eines Zytolysates bekannter Aktivität gegeben. Es wurde gut durchmischt, nach einer Stunde Stehenlassen bei +4°C abzentrifugiert und im Überstand die LDH-Aktivität bestimmt. Die Berechnung des LDH lösenden Raumes erfolgte nach der Formel $V = A/c$ (V = lösender Raum in ml, A = eingebrachte Aktivität in mU, c = Aktivität im Überstand in mU/ml). Es ergab sich ein theoretisch LDH lösender Raum von 3,35 ml (Mittelwert aus sechs Bestimmungen), während der tatsächlich zur Verfügung stehende Raum maximal 3,0 ml betrug.

Dieses Ergebnis muß dahingehend interpretiert werden, daß auch das Agargelsediment LDH löst und sogar adsorbiert. Dies hat einen Verlust an Aktivität im freien lösenden Raum von 10% bis 13% in dem beschriebenen Versuch zur Folge, woraus rechnerisch ein zu großer lösender Raum resultiert. Es ist also berechtigt, das Gesamtvolumen von Sediment und Überstand der Berechnung zugrunde zu legen. Somit läßt sich auch ein Teil des bei der Elutionsmethode beobachteten Aktivitätsverlustes auf die Adsorption von LDH an das Agargel zurückführen.

3. Untersuchungen über die Färbeaktivität der Isoenzyme LDH-I und LDH-V.

Da sich die fünf Isoenzyme der LDH in vielen Eigenschaften unterscheiden (s. o.) war zu prüfen, ob sie unter den vorgegebenen Bedingungen der Färbemethode gleiche Färbeaktivität zeigen, d. h. ob die von einer bestimmten Enzymaktivität in der Zeiteinheit gebildete Farbstoff-

menge bei allen Isoenzymen gleich groß ist. Würden sich unterschiedliche Werte ergeben, wäre eine exakte Bestimmung ihrer prozentualen Verteilung mit der angegebenen Methode nicht möglich.

Die Isoenzyme LDH-I und LDH-V wurden nach der beschriebenen Methode aus Erythrozyten bzw. Leber des Menschen isoliert und in 1/15 M Phosphatpufferlösung pH 7.4 durch Druckdialyse konzentriert. Von beiden Isoenzym-Lösungen wurden je zehn Verdünnungsstufen hergestellt, deren Aktivität im optischen Test bei einer Pyruvatkonzentration von $0,4 \times 10^{-3}$ M/l bestimmt wurde, um vergleichbare Werte zu erhalten (69). Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 0,07 ml auf Agargel aufgetragen. Nach normaler Elektrophorese wurden die Präparate 90 min bei $37^{o}C$ nach der beschriebenen Methode gefärbt, und die gebildeten Farbstoffmengen in einem Extinktions-Integral-Schreiber (Fa. Zeiss) gemessen.

In Abbildung 3 ist für jede Verdünnungsstufe die auf Agargel aufgebrachte LDH-Aktivität (in mU) gegen die gebildete Farbstoffmenge aufgetragen. Für beide Isoenzyme ist die berechnete Regressionsgerade eingezeichnet (Regression erster Art, ungruppierte Stichproben) (23). Die Kurven lassen in dem untersuchten Bereich einen der Enzymaktivität proportionalen Anstieg der Farbstoffbildung erkennen.

An Hand der vorliegenden Stichproben ließ sich ein Unterschied der Regressionskoeffizienten der beiden Regressionsgeraden statistisch (23) nicht sichern ($p > 0,50$). Es darf daher angenommen werden , daß ein praktisch relevanter Unterschied der Färbeaktivitäten der Isoenzyme LDH-I (H_4) und LDH-V (M_4) nicht besteht. Dies muß auch für die übrigen Isoenzyme gelten, da sie aus H- und M-Monomeren zusammengesetzt sind (6, 57).

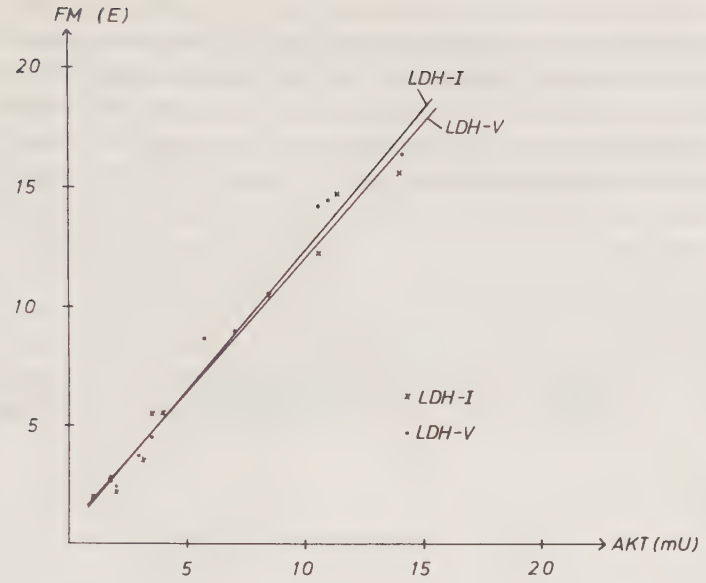

Abb. 3: Vergleich der von LDH-I und LDH-V nach Elektrophorese im Agargel in Abhängigkeit von ihren jeweiligen Aktivitäten gebildeten Farbstoffmengen (AKT = Aktivitäten der Isoenzymfraktionen in mU, FM = gebildete Farbstoffmengen in E = willkürlichen Einheiten). Formeln der Regressionsgeraden: LDH-I: $y = 0{,}74 + 1{,}133x$, LDH-V: $y = 0{,}67 + 1{,}185x$.

4.Einfluß der Färbedauer auf die Darstellung von Isoenzymfraktionen der LDH.

Eine Zytolysatverdünnung von menschlicher Skelettmuskulatur (Verteilung der LDH-Isoenzyme nach der Agargelelutionsmethode: LDH-I: 4,1%, LDH-II: 8,2%, LDH-III: 13,5%, LDH-IV: 10,5%, LDH-V: 63,7%) wurde in Mengen von

je 0,07 ml mit einer Aktivität von 576 mU/ml vielfach auf Agargel aufgetragen (aufgetragene Aktivität aller fünf Fraktionen: 40 mU). Im Verlauf der im Anschluß an die Elektrophorese durchgeführten Färbung wurden die Präparate zu je zwei in zeitlichen Abständen von fünf bzw. zehn Minuten aus der Färbelösung entfernt. Ihre Isoenzymverteilung wurde ermittelt und mit der durch

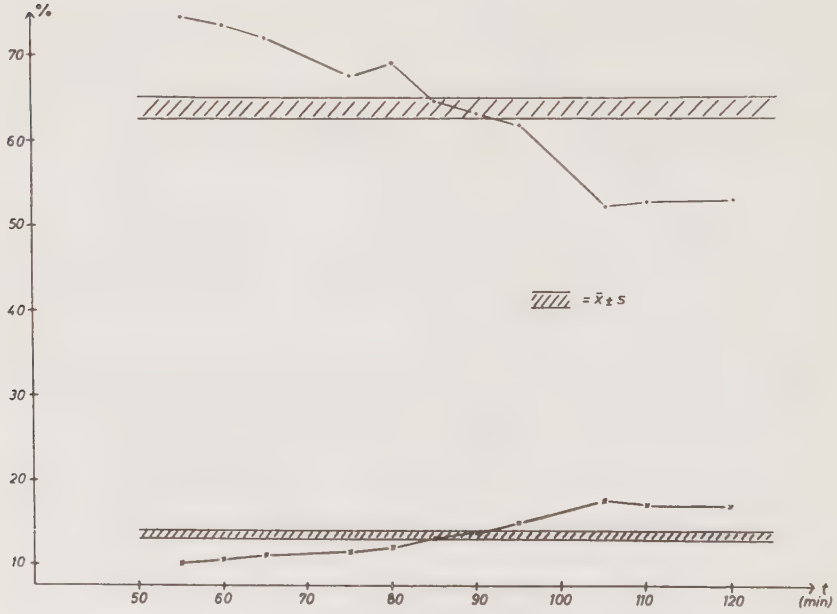

Abb. 4: Abhängigkeit der mit der Färbemethode ermittelten prozentualen Anteile einer aktivitätsstarken und einer aktivitätsschwachen Isoenzymfraktion von der Färbedauer. Die Bereiche, in denen die sich mit der Agargelelutionsmethode ermittelten Werte ($\bar{x} \pm s$) bewegen, sind schraffiert dargestellt.

die Agargelelutionsmethode bestimmten Verteilung verglichen. Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit der mit dem Färbeverfahren ermittelten prozentualen Anteile je einer Fraktion mit hoher und niedriger Enzymaktivität von der Färbedauer (aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit sind die Werte der drei übrigen Isoenzymfraktionen nicht eingezeichnet). Man erkennt deutlich, wie bei zunehmender Färbedauer der relative Anteil der stärkeren Fraktion ab- und der der schwächeren zunimmt. Dieser Effekt ist, wie nachgeprüft wurde, unabhängig von der Art des Isoenzymes und muß besonders dann als Fehlerquelle berücksichtigt werden, wenn in einem Verteilungsmuster Fraktionen sehr unterschiedlicher Stärke auftreten.

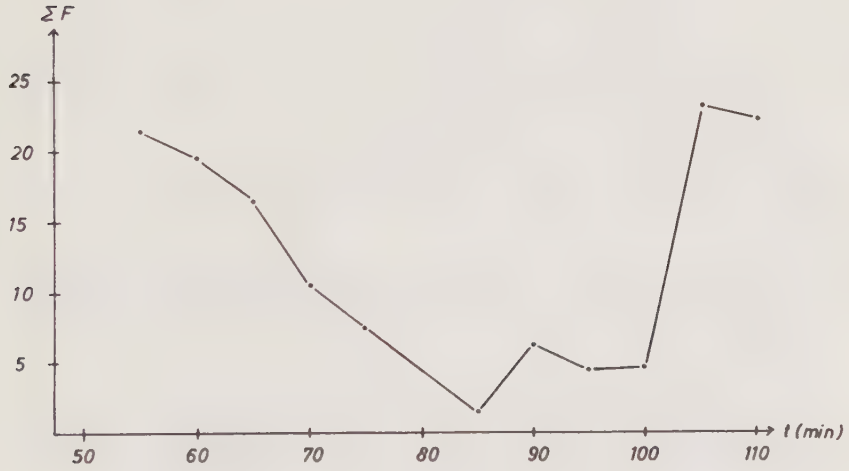

Abb. 5: Abhängigkeit der Summe der fehlbestimmten prozentualen Anteile aller fünf Isoenzymfraktionen (ΣF) von der Färbedauer (bezogen auf die durch die Agargelelutionsmethode gewonnenen Werte).

Die geringsten Abweichungen von den mit der Agargelelutionsmethode ermittelten Werten treten bei den Präparaten auf, die 85 min gefärbt worden sind, wie aus Abbildung 5 zu entnehmen ist, in welcher die Abhängigkeit der Fehlersumme (= Summe der fehlbestimmten prozentualen Anteile aller fünf Isoenzymfraktionen bezogen auf die durch Agargelelution festgestellte Verteilung) von der Färbedauer aufgetragen ist. Dieser Wert war reproduzierbar, sofern die zur Elektrophorese aufgetragene Aktivität der LDH nicht wesentlich über 40 mU lag.

Um dieses Verhalten genauer zu analysieren, wurde die Abhängigkeit der Farbstoffbildung von der Färbedauer untersucht. Es ergab sich, daß man drei Phasen der Farbstoffbildung unterscheiden kann (siehe Abbildung 6).

1. Initialphase: In den ersten 40 bis 50 Minuten erfolgt unter den gewählten Bedingungen nur eine geringgradige Anfärbung. Es darf angenommen werden, daß zumindest ein Teil dieser Zeit notwendig ist, damit eine genügend grosse Menge Substrat und anderer Bestandteile der Färbelösung in das Gel diffundieren und ein Ausgleich der pH-Werte des Gels und der Inkubationslösung stattfinden kann.

2. Lineare Phase: Im Anschluß an die Initialphase folgt eine Phase, in der nahezu eine direkte Proportionalität zwischen Färbedauer und gebildeter Farbstoffmenge besteht.

3. Hemmphase: Schließlich läßt die Intensität der Farbstoffbildung wieder nach, und zwar umso früher, je höher die Aktivität der betreffenden Fraktion ist, d. h. je mehr Metaboliten, denen eine Hemmwirkung zugeschrieben werden muß, sich am Orte der Enzymaktivität anhäufen. Darüber hinaus kommt zusätzlich eine Substratverarmung in der Umgebung hoher Enzymaktivitäten in Frage (101). Wie aus dem Beispiel in Abbildung 6 hervorgeht, erreicht die stärkere Fraktion nach ca. 80 min die dritte Phase, während die schwächere Fraktion über

den gesamten Beobachtungszeitraum in der zweiten Phase verbleibt und somit ab der 80. Minute relativ mehr Farbstoff bildet als die stärkere Fraktion. Hierdurch erklärt sich der bei Anwendung der Färbemethode auftretende übermäßig hohe ermittelte prozentuale Anteil der schwächeren Fraktionen bei zu langer Färbung.

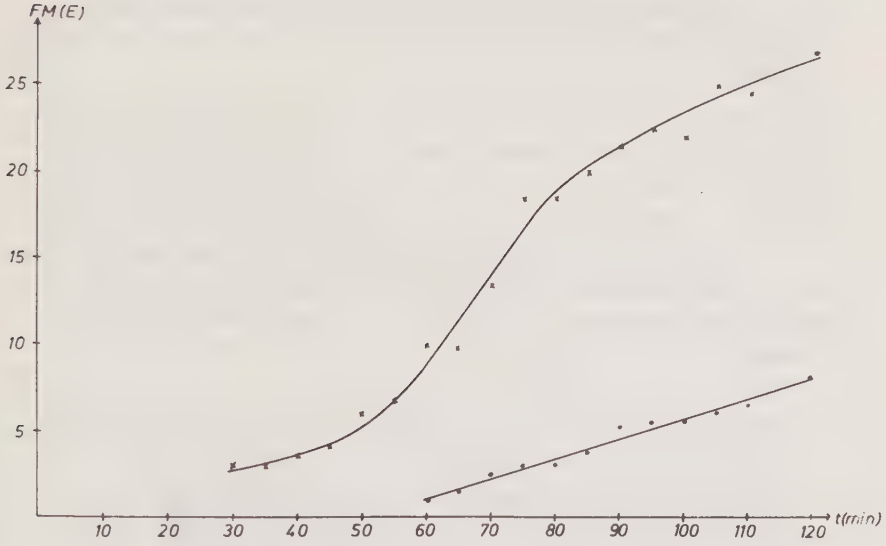

Abb. 6: Abhängigkeit der gebildeten Farbstoffmenge von der Färbedauer bei einer aktivitätsreichen (x) (25 mU) und einer aktivitätsarmen (•) (5,5 mU) LDH-Isoenzymfraktion. Angabe der gebildeten Farbstoffmenge (FM) in willkürlichen Einheiten (E),der Zeit (t) in Minuten (min).

Unklar bleibt jedoch, warum bei zu kurzer Färbedauer die stärkeren Fraktionen einen relativ zu hohen Prozent-

anteil aufweisen (siehe Abbildung 4). Aus Abbildung 6 geht jedoch hervor, daß von der 30. bis zur 60. Minute im Gegensatz zur stärkeren Fraktion die aktivitätsärmere Fraktion noch nicht nachweisbar war. Die Ursache hierfür dürfte am ehesten in einer unzureichenden Empfindlichkeit des Auswertungsgerätes für schwache Fraktionen zu suchen sein.

5. Einfluß der zur Elektrophorese aufgetragenen Enzymaktivität der LDH auf die Ermittlung ihrer Isoenzymverteilung.

Je 0,07 ml der Verdünnungsreihe eines Zytolysates aus menschlicher Skelettmuskulatur (LDH-Isoenzymverteilung s. o.) wurden elektrophoretisch in Agargel aufgetrennt und die Isoenzymverteilungen der LDH nach dem beschriebenen Verfahren durch Färbung bestimmt (je Verdünnungsstufe zwei Präparate, Färbedauer: 85 min). Die in den einzelnen Verdünnungsstufen ermittelten Isoenzymmuster wurden mit der durch die Agargel-Elutions-Methode festgestellten Verteilung verglichen.

In Abbildung 7 ist das Verhalten der prozentualen Anteile einer aktivitätsarmen und einer aktivitätsreichen Isoenzymfraktion in Bezug auf die zur Elektrophorese aufgetragenen Gesamtaktivität aller LDH-Isoenzyme dargestellt (aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit sind die Werte der drei übrigen Isoenzymfraktionen des Zytolysates nicht eingetragen): mit steigender Enzymaktivität nimmt der relative Anteil der stärkeren Fraktion ab und der schwächeren Fraktion zu. Auch dieser Effekt ist unabhängig von der Art des Isoenzymes und besonders ausgeprägt, wenn in einem Verteilungsmuster Isoenzyme sehr unterschiedlicher Stärke auftreten. Das Ergebnis war mit Zytolysaten anderer Herkunft und Isoenzymzusammensetzung reproduzierbar.

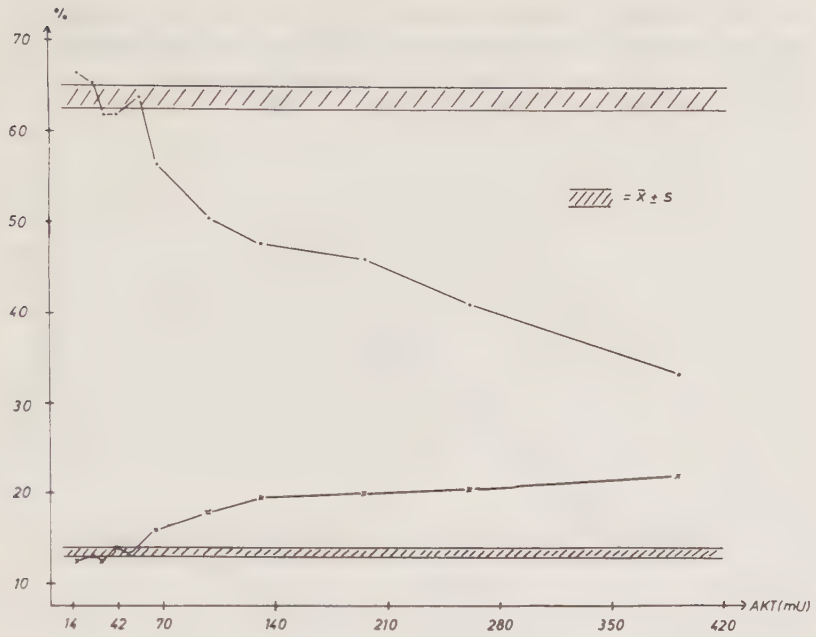

Abb. 7: Abhängigkeit der mit der Färbemethode ermittelten prozentualen Anteile einer aktivitätsreichen und einer aktivitätsarmen LDH-Isoenzymfraktion eines Skelettmuskel-Zytolysates von dem Gesamt-LDH-Auftrag, dessen Aktivität (AKT) in mU angegeben ist. Die Bereiche, in denen sich die durch Agargelelution ermittelten Werte bewegen ($\bar{x} \pm s$) sind schraffiert dargestellt. Färbedauer: 85 min.

Die Beziehung zwischen der Fehlersumme (= Summe der fehlbestimmten prozentualen Anteile aller LDH-Isoenzymfraktionen bezogen auf die durch Agargelelution festgestellte Isoenzymverteilung) und der zur Elektrophore-

se aufgetragene Gesamtaktivität der LDH ist in Abbildung 8 dargestellt. Die geringsten Abweichungen treten bei einem Auftrag von 35 bis 40 mU Gesamt-LDH auf.

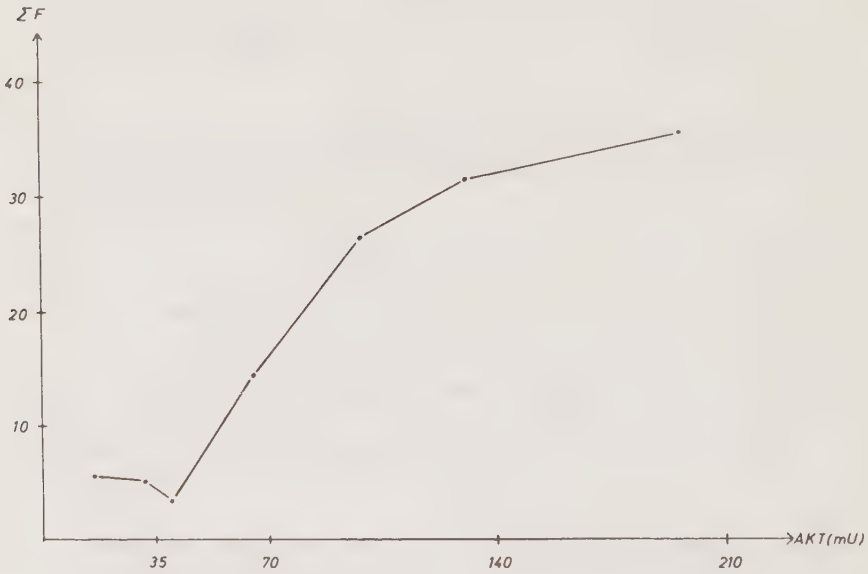

Abb. 8: Abhängigkeit der Summe der fehlbestimmten prozentualen Anteile aller fünf LDH-Isoenzymfraktionen (ΣF) von der aufgetragenen Gesamt-LDH-Aktivität (bezogen auf die durch das Agargel-Elutions-Verfahren gewonnenen Werte).

Um diese Verschiebungen der mit der Färbemethode ermittelten prozentualen Anteile der einzelnen LDH-Isoenzymfraktionen genauer zu untersuchen, wurde die Abhängigkeit der Farbstoffbildung von der Aktivität der Isoenzymfraktionen im Agargel untersucht.

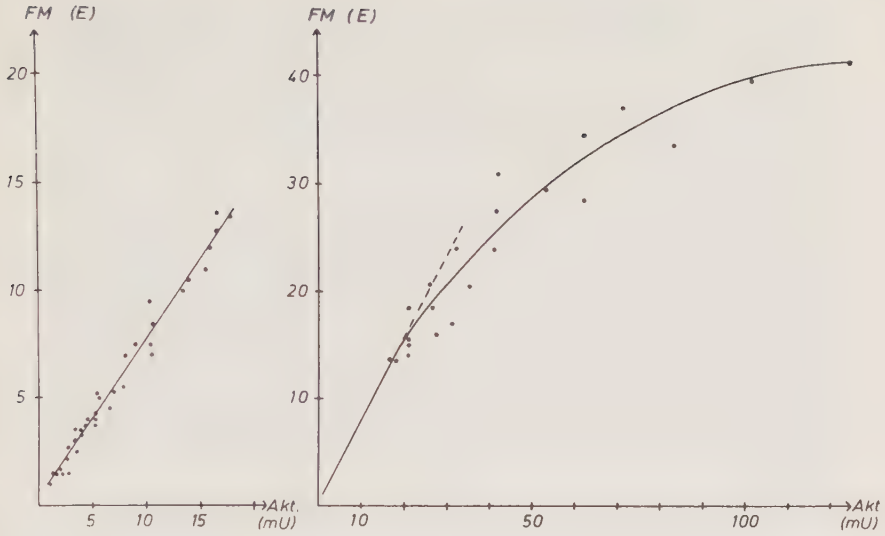

Abb. 9: Abhängigkeit der von einer LDH-Isoenzymfraktion in 85 min im Agargel gebildeten Farbstoffmenge von der Aktivität dieser Fraktion.
Linke Abb.: Aktivitätsbereich 1- 18 mU.
Rechte Abb.: Aktivitätsbereich 1 - 130 mU.
Angabe der gebildeten Farbstoffmenge (FM) in willkürlichen Einheiten (E), der Aktivität der Isoenzymfraktionen (AKT) in mU.

Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt und zeigt, daß eine direkte Proportionalität zwischen der von einem Isoenzym gebildeten Farbstoffmenge und dessen Aktivität besteht, sofern diese 20 mU nicht überschreitet.

Liegt die Aktivität eines Isoenzymes über diesem Wert, so besteht diese strenge Proportionalität nicht mehr, da dann im Verhältnis zur Enzymaktivität zu wenig Farbstoff gebildet wird, was dazu führt, daß für dieses Isoenzym ein relativ zu niedriger Prozentanteil gemessen wird.

Die Ursache für dieses Verhalten dürfte darin zu suchen sein, daß die Substratkonzentration im Agargel nicht ausreicht, um bei hohen Enzymaktivitäten alle Enzymmoleküle abzusättigen (72, 100), da dann mehr Substrat verbraucht wird als in der gleichen Zeit nachdiffundieren kann. Eine Hemmung der Enzymaktivität durch in höherer Konzentration anfallende Reaktionsprodukte am Orte hoher Enzymaktivitäten muß gleichfalls diskutiert werden.

Wird darauf geachtet, daß die zur Elektrophorese aufgetragene Aktivität eines jeden Isoenzymes 20 mU nicht übersteigt, und die für diesen Aktivitätsbereich optimale Färbedauer von 85 min eingehalten wird, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung der mit dem Färbeverfahren und der mit der Agargelelutionsmethode gewonnenen Werte (siehe Tabelle 3).

			LDH-		
Verfahren	I	II	III	IV	V
Agargelelution[1)]	4,1	8,2	13,5	10,5	63,7
Färbung[2)]	4	9	14	11	62

Tab. 3: Gegenüberstellung der mit der Agargelelutionsmethode und dem standardisierten Färbeverfahren (Färbedauer: 85 min, maximale Einzelfraktionsaktivität unter 20 mU) ermittelten LDH-Isoenzymverteilungsmuster eines Skelettmuskel-Zytolysates (Angabe der Werte in Rel.-%).

1) Mittelwerte aus fünf Bestimmungen
2) Mittelwerte aus zwei Bestimmungen

6. Die Bedeutung der "nothing dehydrogenase" als Fehlerquelle für die Bestimmung der Verteilung der Isoenzyme der LDH des Blutserums.

Untersuchungen von ZIMMERMANN et al. (113) haben gezeigt, daß in histologischen Schnitten auch bei Fehlen von Substrat (Lactat) in der Färbelösung Farbstoffniederschläge aus Formazan auftreten können. Dieses Phänomen, das als "nothing dehydrogenase" bezeichnet wird, wird wahrscheinlich durch eine Reduktion der Tetrazoliumsalze der Färbelösung durch Sulfhydrilgruppen bestimmter Proteine hervorgerufen (113). Derartige unspezifische Anfärbungen wurden von PLASS et al. (71) auch im Albumin- und Postalbuminbereich elektrophoretisch aufgetrennter Seren nachgewiesen (vgl. Abbildung 10).

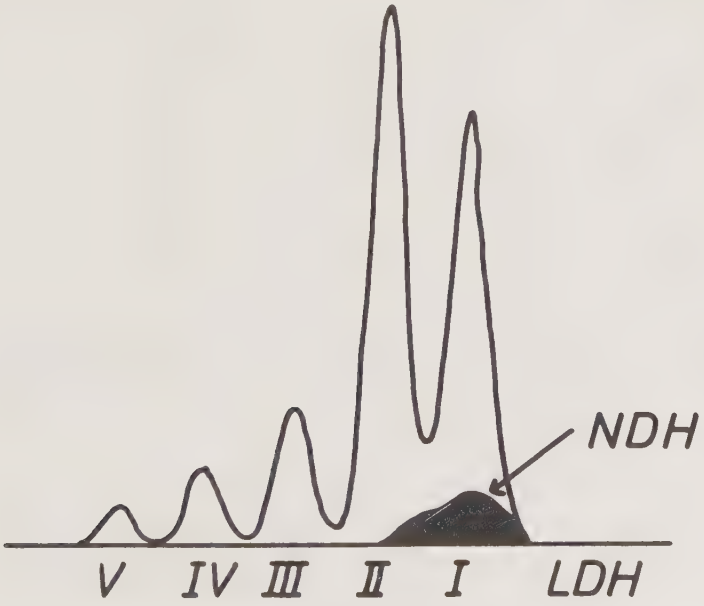

Abb. 10: Lage der "nothing dehydrogenase" (NDH) nach Elektrophorese im Agargel bei pH 8.4 im Vergleich zur Position der Isoenzyme der LDH.

Ob durch die "nothing dehydrogenase" die Genauigkeit der Bestimmung der Isoenzymverteilung der SLDH mit Hilfe der Färbemethode beeinträchtigt wird, wurde nach Kenntnis der vorliegenden Literatur bisher nicht untersucht. Es wurde daher bei verschiedenen Serumproben geprüft, ob und in wieweit die "nothing dehydrogenase" die Resultate beeinflußt. Der durch die "nothing dehydrogenase " hervorgerufene Fehler kann durch Subtraktion des Flächenintegrals der Extinktionskurve der unspezifischen Farbstoffniederschläge von dem Flächenintegral der Extinktionskurve der mit Substrat gefärbten Probe desselben Serums eliminiert werden, wenn man wie in Abbildung 10 beide Kurven übereinanderprojiziert. Die mit diesem Subtraktionsverfahren erhaltenen Werte wurden mit den unkorrigierten Werten verglichen, und es ergab sich, daß infolge der

SLDH-		I	II	III	IV	V
$\bar{x}$	a.)[1]	+3,5	-1,5	-1,2	-0,4	-0,4
	b.)[2]	+7,0	-3,3	-1,9	-0,9	-0,9
s	a.)	1,3	1,0	0,5	0,2	0,4
	b.)	2,9	1,5	1,1	0,6	0,5

Tab. 4: Der durch die "nothing dehydrogenase" bei der Bestimmung der Verteilung der LDH-Isoenzyme im Serum verursachte Fehler (a: bei erhöhten SLDH-Aktivitäten (über 240 mU/ml), b: bei nicht erhöhten SLDH-Aktivitäten). Die Zahlen geben an, um wieviel Prozentwerte die einzelnen Fraktionen bei den untersuchten Seren zu hoch (+) bzw. zu niedrig (-) ausfielen. Isoenzymmuster der untersuchten Seren: siehe Text.

1) Mittelwerte aus 12 Bestimmungen
2) Mittelwerte aus 6 Bestimmungen

"nothing dehydrogenase" der Anteil der LDH-I im Serum zu hoch ausfällt: bei den untersuchten Seren lag bei erhöhter SLDH-Aktivität (über 240 mU/ml) die Fraktion LDH-I um 3,5 ± 1,3, bei SLDH-Aktivität im Normbereich um 7,0 ± 2,9 Prozentwerte zu hoch (siehe Tabelle 4). Dementsprechend fielen die übrigen Fraktionen zu niedrig aus. Die untersuchten Seren mit erhöhter LDH-Aktivität wiesen neunmal den Verteilungstyp A und je einmal die Verteilungstypen B und C auf, während ein Serum keinem der drei Verteilungstypen zugeordnet werden konnte. Die sechs Seren mit nicht erhöhter LDH-Aktivität zeigten mit einer Ausnahme des Verteilungstyps B keine pathologischen Muster.

Diese Ergebnisse zeigen, daß insbesondere bei Seren mit niedrigen, nicht erhöhten LDH-Aktivitäten die "nothing dehydrogenase" zu einer nicht unerheblichen Beeinflussung der Resultate im beschriebenen Sinne führt, während bei Seren mit hohen LDH-Werten dieser Fehler deutlich geringer wird und bei sehr hohen Aktivitäten in einem zu vernachlässigenden Bereich liegen dürfte, da mit zunehmender LDH-Aktivität sich die Relation Farbstoffbildung durch die LDH zu Farbstoffbildung durch die "nothing dehydrogenase" immer mehr zugunsten der ersteren verschiebt. Andererseits werden Seren mit hohen LDH-Aktivitäten zur Isoenzymbestimmung verdünnt, was zu einer Konzentrationsabnahme reduzierender Serumsubstanzen und damit zu einer Verringerung der Farbstoffbildung durch die "nothing dehydrogenase" führt.

7. Zusammenfassung.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß die beschriebene Methode zur Bestimmung der Verteilung der Isoenzyme der LDH (Färbeverfahren) nur unter ganz bestimmten Bedingungen exakte Werte liefert:

1.) Die Färbedauer muß 85 min betragen.
2.) Die Aktivität einer Isoenzymfraktion darf 20 mU nicht überschreiten. Daher sollten nie mehr als 35 bis 40 mU LDH-Gesamtaktivität aufgetragen werden. Zu niedrige Aktivitäten sind jedoch ebenfalls ungünstig, da hier die Erschwerung der Auswertung eine Fehlerquelle darstellt.
3.) Unter den vorgegebenen Bedingungen ist mit einer Streuung der Werte der Einzelbestimmungen der Isoenzymfraktionen um maximal $\pm$ 10% (Standardabweichung) zu rechnen. Zur Verkleinerung dieses Fehlers wurden deshalb durchweg Doppelbestimmungen durchgeführt.
4.) Bei der Bestimmung der Verteilung der LDH-Isoenzyme im Serum tritt auch unter Berücksichtigung der erwähnten Richtlinien infolge der "nothing dehydrogenase" ein richtungsgebundener Fehler auf, dessen Ausschaltung auf befriedigende Weise nicht möglich ist. Es ist daher anzunehmen, daß in den folgenden Serumuntersuchungen (Seren mit erhöhter LDH-Aktivität) die Werte, die für die Isoenzymfraktion I ermittelt wurden, ca. 3 bis 4 Prozentwerte zu hoch ausgefallen sind.

C. Ergebnisse der Untersuchungen über die Entstehung des tumorspezifischen Verteilungsmusters der Isoenzyme der LDH im Serum von Patienten mit akuter Leukose.

Es wurden bei Fällen von akuter Paraleukoblastose die Isoenzymverteilungsmuster der LDH in Serum und Paraleukoblasten verglichen, um Rückschlüsse auf die Herkunft der erhöhten SLDH zu erhalten. Diese Fälle wurden zur Untersuchung ausgewählt, da bei akuter Paraleukoblastose meist eine SLDH-Erhöhung mit dem tumorspezifischen Verteilungstyp vorliegt (115), und tumorös veränderte Zellen (Paraleukoblasten) in großer Reinheit aus dem Blut dieser Patienten isoliert werden können.

Das Ergebnis des Vergleiches der LDH-Isoenzymverteilungsmuster in Serum und Paraleukoblasten dieser Patienten wurde durch Untersuchungen über die Abgabe von LDH-Isoenzymen durch Paraleukoblasten im Inkubationsversuch und über die selektive Inaktivierung bestimmter Isoenzyme durch Serumbestandteile und durch Auswertung weiterer Labordaten zur Überprüfung anderer möglicher Herkunftsorte der erhöhten SLDH abgesichert. Um Rückschlüsse auf unterschiedliche Eliminationsgeschwindigkeiten der LDH-Isoenzyme beim Menschen zu erhalten, wurde der Abfall erhöhter SLDH-Werte nach Myocardinfarkten und akuten Leberparenchymschäden verglichen.

1. Vergleich der Isoenzymverteilungsmuster der LDH in Serum und Paraleukoblasten bei Patienten mit akuter Paraleukoblastose.

a.) Verteilung der LDH-Isoenzyme in Serum und Paraleukoblasten: Bei acht Patienten[1)] der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, die an akuter Paraleukoblastose litten, wurden die Isoenzymverteilungsmuster der LDH im Serum und in den weißen Blutzellen untersucht. Aus technischen Gründen wurden nur solche Patienten her-

1) Krankenblatt-Nummern siehe Tabelle 9

Autor	LDH-Isoenzymfraktion I	II	III	IV	V
WRIGHT et al. (105)	32,8 ±5,7	46,6 ±3,3	16,4 ±4,3	2,5 ±1,0	1,5 ±0,8
ZONDAG (115)	39,7 33-45	45,5 40-51	11,2 7,5-15,5	2,2 0,8-5,5	1,4 0,5-3,5
LEHMANN et al. (49)	29,8 ±6,6	51,6 ±5,0	11,6 ±2,8	4,0 ±1,5	3,0 ±1,3
eigene Untersuchungen	39,4 ±2,8	45,3 ±2,2	9,4 ±2,2	3,1 ±0,8	2,6 ±1,0

Tab. 5: Verteilung der LDH-Isoenzyme im Serum gesunder Personen (eigene Untersuchungen: Mittelwerte 20 gesunder Blutspender). Zahlenangabe in Prozent der Gesamtaktivität.

angezogen, die mehr als 30 000 Leukozyten/mm^3 Blut aufwiesen. Eine Selektion nach anderen Kriterien erfolgte nicht. Die Blutproben für Serumgewinnung und Leukozytenisolierung wurden morgens vom nüchternen Patienten unmittelbar nacheinander abgenommen und sofort nach den beschriebenen Richtlinien aufgearbeitet. Zwei Patienten wurden ein zweites Mal untersucht, nachdem bei ihnen im Anschluß an eine Remission ein Rezidiv eintrat.

Alle Patienten weisen eine Erhöhung der SLDH über den obersten Normalwert (240 mU/ml) auf. Die einzelnen Werte liegen zwischen 308 mU/ml und 1995 mU/ml (Mittelwert: 1152 ± 634 mU/ml). Die gefundenen Isoenzymverteilungsmuster der SLDH dieser Patienten sind in Tabelle 6 niedergelegt. Zum Vergleich hierzu gibt Tabelle 5 die Normalwerte gesunder Personen wieder. Alle Patienten zeigen in ihren Verteilungsmustern eine relative

Nr.	Pat.	LDH[1)]	LDH-Isoenzym I	II	III	IV	V
1	No.Jö.	1620	18,5	52,5	24,5	3,5	1
2	Bu.An.I	1250	17	42	26	13	2
3	Bu.An.II	1920	21	39	26,5	11,5	2
4	Re.Ma.	309	31	37	22	8	2
5	La.To.	640	29	46	20	4	1
6	Me.Ka.	1149	41	44	11	3	1
7	Bu.Li.	1995	19	38	29	12,5	1,5
8	Gö.An.I	720	20,5	45	22,5	9	3
9	Gö.An.II	1610	19	46	19	12	4
10	Kl.Ma.	308	25	40,5	20,5	11	3
$\bar{x}$		1152	24,1	43,0	22,1	8,8	2,1
s		634	6,8	4,4	5,0	3,8	0,9

Tab.6: Prozentuale Verteilung der LDH-Isoenzyme im Serum von Patienten mit akuter Paraleukoblastose.
1) LDH-Gesamtaktivität der Seren in mU/ml.

Erhöung der Fraktionen LDH-III und LDH-IV, während die relativen Anteile der LDH-I und meist auch der LDH-V erniedrigt sind. Die prozentuale Stärke der Fraktion LDH-II ist praktisch unverändert(siehe Tabelle 7). Betrachtet man die absoluten Werte der Aktivitäten, so findet man eine Erhöhung aller Isoenzymfraktionen, am stärksten erhöht sind jedoch die LDH-II und LDH-III. Lediglich bei Fall 6 (Pat. Me. Ka.) sind die Veränderungen weniger ausgeprägt.

LDH-	I	II	III	IV	V
$\bar{x}$	61%	95%	235%	283%	79%
s	19	10	54	126	39

Tab. 7: Zunahme bzw. Abnahme des relativen Anteils der einzelnen LDH-Isoenzyme im Serum von Patienten mit akuter Paraleukoblastose gegenüber Normalseren (Normalwerte = 100%). Mittelwerte aus 10 Untersuchungen bei 8 Patienten.

			LDH-Isoenzym				
Nr.	Pat.	LDH[1)]	I	II	III	IV	V
1	No.Jö.	6095	2,5	22	34	26	15,5
2	Bu.An.I	3840	2	15	32	32	19
3	Bu.An.II	4911	2	8	38	42	10
4	Re.Ma.	6623	2	15	31	31	21
5	La.To.	10966	13,5	34,5	36	15	1
6	Me.Ka.	6598	2,5	25	40	23,5	9
7	Bu.Li.	-	4,5	20	41,5	29	5
8	Gö.An.I	-	6,0	19,5	30	28	16,5
9	Gö.An.II	-	6	23	30	26	15
10	Kl.Ma.	-	8	23	28	26	15
$\bar{x}$		-	4,9	20,5	34,0	27,9	12,7
s			3,7	6,2	4,2	6,6	6,3

Tab. 8: Prozentuale Verteilung der LDH-Isoenzyme in den weißen Blutzellen von Patienten mit akuter Paraleukoblastose.
1) LDH-Aktivität/Leukozyt in mU x 10^{-8}.

Tabelle 8 gibt die in den weißen Blutzellen derselben Patienten gefundenen Verteilungen der LDH-Isoenzyme wieder. Die leukämischen Leukozyten haben ihr Aktivitätsmaximum meist in der LDH-III, weisen sonst aber erhebliche Unterschiede auf, vor allem in Bezug auf die Stärke der Fraktion LDH-V.

Der Anteil der Paraleukoblasten an den untersuchten Zellen betrug im Mittel 90,6 ± 6,2%, der jugendlicher, stabkerniger und segmentkerniger Granulozyten 4,4 ± 4,2% und der der Lymphozyten 5,0 ± 4,8% (siehe Tabelle 9).

Nr.	Pat.	Kr.-Bl.-Nr.[1)]	Blasten	Granuloz.	Lymphoz.
1	No.Jö.	21 993	87	9	4
2	Bu.An.I	22 533	89	1	10
3	Bu.An.II	22 533	98	2	0
4	Re.Ma.	22 682	98	1	1
5	La.To.	24 293	98	0	2
6	Me.Ka.	24 641	90	10	0
7	Bu.Li.	1097/68	85	1	14
8	Gö.An.I	19 835	95	1	4
9	Gö.An.II	19 835	83,5	12,5	4
10	Kl.Ma.	18 817	83,5	5	11,5
$\bar{x}$			90,6	4,4	5,0
s			6,2	4,2	4,8

Tab.9: Verteilung der auf ihre LDH-Isoenzym-Zusammensetzung untersuchten Leukozyten von Patienten mit akuter Paraleukoblastose (Blasten = Paraleukoblasten, Granuloz. = jugendliche, stabkernige und segmentkernige Granulozyten, Lymphoz. = Lymphozyten). Werte in Relativprozent der Gesamtleukozytenzahl.

1) Kranken-Blatt-Nummern

Da reife Granulozyten eine stark ausgeprägte LDH-V besitzen (21), wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizienten von Kendall geprüft (51), ob eine Beziehung zwischen der Höhe der LDH-V und dem prozentualen Anteil der reifen Granulozyten an den untersuchten Leukozyten besteht. Es konnte jedoch eine derartige Korrelation nicht nachgewiesen werden($p > 0,4$). Ebensowenig gibt es Anhaltspunkte für eine Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil der Lymphozyten (Lymphozyten haben nach (22) eine ausgeprägte LDH-II) und der Höhe der Fraktion LDH-II der untersuchten Leukozyten ($p > 0,4$). Die beobachteten Divergenzen zwischen den Verteilungsmustern dieser Zellen müssen daher in erster Linie auf eine unterschiedliche LDH-Isoenzymzusammensetzung der Paraleukoblasten der einzelnen Patienten und weniger auf eine Verunreinigung der Leukozyten-Präparationen durch Lymphozyten und reife Granulozyten zurückgeführt werden.

b.) Vergleich der Isoenzymmuster von Serum und Paraleukoblasten der untersuchten Patienten: Unter der Annahme eines einfachen Überlagerungsmechanismus können durch Subtraktion des normalen Serumverteilungsmusters der LDH von einem pathologisch veränderten Serummuster mit erhöhter SLDH-Aktivität Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der zusätzlich ins Serum eingeströmten LDH gezogen werden. Entsprechende Berechnungen wurden mit den Serumwerten der untersuchten Patienten durchgeführt (siehe Beispiel).

Nimmt man an, daß die zusätzliche SLDH bei den untersuchten Patienten aus den Paraleukoblasten stammt, was am naheliegendsten erscheint, so müßten zusätzliche SLDH und die LDH der Paraleukoblasten identische Verteilungsmuster aufweisen. Der Vergleich der beiden Muster mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (51) durch paarweise Gegenüberstellung der fünf Isoenzymfraktionen ergab jedoch, daß die beiden Verteilungsmuster nicht identisch sind ($p < 0,01$).

Beispiel (Pat. Bu. An. II):

LDH-	I	II	III	IV	V	gesamt
Pat. Serum	21	39	26,5	11,5	2	100%
	403,2	748,8	508,8	220,8	38,4	1920 mU/ml
Norm.Serum	66,3	76,1	15,8	5,4	4,4	168 mU/ml[1)]
zusätzl.	336,9	672,7	493,0	215,4	34,0	1752 mU/ml
SLDH	19,2	38,4	28,1	12,3	2,0	100%
Paraleukobl.	2	8	38	42	10	100%

1) Mittlerer Normalwert der SLDH-Aktivität

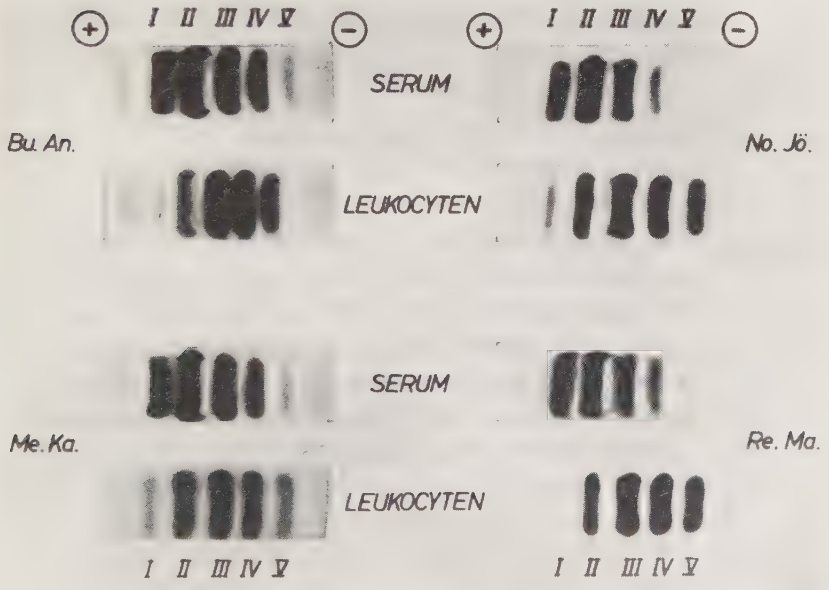

Abb. 11: Gegenüberstellung der in Serum und Paraleukoblasten von Pateinten mit akuter Paraleukoblastose gefundenen Verteilungsmuster der LDH-Isoenzyme.

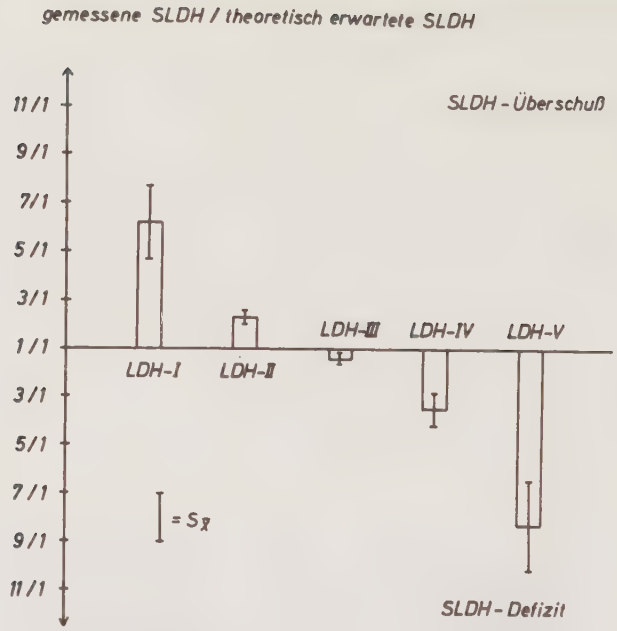

Abb. 12: Vergleich des Musters der zusätzlich im Serum bei Patienten mit akuter Paraleukoblastose gefundenen LDH-Isoenzyme mit der LDH-Verteilung in den Paraleukoblasten (= theoretisch zu erwartende zusätzliche SLDH) durch Bildung der Quotienten aus den Prozentwerten der jeweiligen Isoenzymfraktionen beider Verteilungen. Mittelwerte aus 10 Untersuchungen bei 8 Patienten.

Es konnten jedoch folgende Regelmäßigkeiten festgestellt werden: Von den Fraktionen LDH-I und LDH-II findet man in der zusätzlichen SLDH immer höhere Werte als erwartet, während der Anteil der restlichen Isoenzyme vergleichsweise zu niedrig ist. Hierbei nimmt der Quotient gefundene zusätzliche SLDH/theoretisch erwartete SLDH (= LDH der Paraleukoblasten) kontinuierlich von der LDH-I zur LDH-V ab, wie dies in Abbildung 12 dargestellt ist.

2. Abgabe von LDH-Isoenzymen an das Inkubationsmedium durch inkubierte Paraleukoblasten.

Die fehlende Übereinstimmung der Isoenzymverteilungsmuster in den Paraleukoblasten und im Serum der Leukosepatienten könnte dadurch bedingt sein, daß bestimmte Isoenzyme bevorzugt von den Paraleukoblasten abgegeben werden. Um diese Frage abzuklären, wurden Paraleukoblasten von drei Patienten insgesamt sechsmal 3 h unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert, und die Isoenzymverteilungsmuster der LDH in den Zellen und im Inkubationsmedium verglichen (siehe Tabelle 10).

Die Zellen verloren während der Inkubation von ihrer LDH-Gesamtaktivität ca. 1%/h an das umgebende Medium. Eine meßbare Abnahme der Zellzahl konnte während der dreistündigen Inkubation nicht festgestellt werden.

Die Verteilungsmuster der LDH-Isoenzyme in den inkubierten Paraleukoblasten und im Inkubationsmedium zeigen im Rahmen der methodischen Fehlerbreite eine gute Übereinstimmung. Systematische Abweichungen, die die beschreibene Diskrepanz erklären könnten, finden sich nicht. Es besteht somit kein Anhaltspunkt dafür, daß bestimmte Isoenzyme bevorzugt von den Paraleukoblasten abgegeben werden.

Nr.	Pat.	LDH-Isoenzym I	II	III	IV	V	Anteil Blasten
1	La.To.	13,5	34,5	35	15	2	98%
2	Me.Ka.I	2,5	25	40	23,5	9	90%
3	Me.Ka.II	2,5	25	40	23,5	9	90%
4	Wo.We.I	1,5	19	41	32	6	96%
5	Wo.We.II	1,5	19	41	32	6	96%
6	Wo.We.III	2	16	41	34,5	6,5	97%
$\bar{x}$		3,9	23,1	39,7	26,8	6,5	95%

Tab. 10a: Verteilung der LDH-Isoenzyme in den inkubierten Paraleukoblasten. Angabe der Werte in Relativprozent.

Nr.	Pat.	LDH-Isoenzym I	II	III	IV	V
1	La.To.	11,5	33,5	38,5	14,5	2
2	Me.Ka.I	3,5	28,5	37,5	20	10,5
3	Me.Ka.II	7,5	25,5	33,5	22,5	11
4	Wo.We.I	1	15	41	35,5	7,5
5	Wo.We.II	1	17,5	44,5	30,5	6,5
6	Wo.We.III	2	14,5	42,5	32	9
$\bar{x}$		4,4	22,4	39,6	25,8	7,8

Tab. 10b: Verteilung der LDH-Isoenzyme im Inkubationsmedium. Angabe der Werte in Relativprozent.

3. Ausschluß selektiver Inaktivierung von LDH-Isoenzymen durch Serumbestandteile.

Es ist denkbar, daß die beschriebene Diskrepanz der Verteilungsmuster der LDH in Serum und Paraleukoblasten, bedingt durch ein Defizit der kathodisch wandernden Isoenzyme im Serum, durch eine selektive Inaktivierung dieser Fraktionen durch Serumbestandteile oder auch durch deren mit Aktivitätsverlust verbundenen Bindung an andere Serumproteine zustande kommt.

Diese Fragestellung wurde dadurch überprüft, daß kleine Zytolysatmengen mit Überwiegen der Isoenzyme LDH-I und LDH-II (Erythrozyten) bzw. LDH-V (Leber) zu je vier verschiedenen Serumproben mit normaler LDH-Aktivität gegeben

Serum-Nr.	zugegebenes Zytolysat	Soll-Aktivität[1)]	gemessene Aktivität absolut[1)]	gemessene Aktivität %[2)]
1	Erythrozyten	500	500	100,0
2	"	500	492	98,4
3	"	500	509	102,2
4	"	500	500	100,0
$\bar{x}$	Erythrozyten	500	500,3 ± 5,9	100,2
1	Leber	500	500	100,0
2	"	500	475	95,0
3	"	500	492	98,4
4	"	500	500	100,0
$\bar{x}$	Leber	500	491,8 ± 10,2	98,4

Tab. 11: Soll-Aktivität und gemessene Aktivität in Gemischen aus Seren und Zytolysaten von Erythrozyten bzw. Leber (Mensch).

1) in mU/ml

2) in Prozent der Soll-Aktivität

wurden. Nach gutem Durchmischen wurde eine Stunde später die Aktivität des Gemisches gemessen und mit der aus der ursprünglichen Serumaktivität und der Aktivität des Zytolysates errechneten Soll-Aktivität verglichen. Zwischen gemessener und Soll-Aktivität ergab sich eine gute Übereinstimmung (siehe Tabelle 11), und zwar betrug bei den Mischungen Serum + hämolysierte Erythrozyten die gemessene Aktivität im Mittel 100,2% der Soll-Aktivität, während bei den Mischungen Serum + Leberzytolysat die gemessene Aktivität im Durchschnitt 98,4% der Soll-Aktivität erreichte. Die geringen Abweichungen um 0,2% bzw. 1,6% lassen sich durch die methodische Fehlerbreite der Einzelbestimmungen erklären und können nicht auf eine selektive Inaktivierung von LDH-Isoenzymen durch Serumbestandteile zurückgeführt werden, welche die beschriebene Diskrepanz deuten könnte.

4. Ausschluß bestimmter anderer Herkunftsorte der erhöhten SLDH-Aktivität der untersuchten Patienten.

Eine Abgabe von LDH aus Organen und anderen Zellen, insbesondere Erythrozyten, könnte die Ursache für die fehlende Übereinstimmung der Isoenzymverteilungsmuster in Serum und Paraleukoblasten sein. Bei den untersuchten Patienten konnte eine Beeinflussung des Isoenzymverteilungsmusters des Serums durch Verlust von LDH aus den folgenden Organen und Zellen durch Auswertung weiterer Labordaten (siehe Tabelle 11a) weitgehend ausgeschlossen werden:

a.) Erythrozyten: Ein wichtiges Kriterium für den Ausschluß hämolytischer Vorgänge stellen die Serum-Haptoglobinwerte dar, die bei den untersuchten Patienten alle über dem untersten Normalwert von 25 mg% liegen. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß normale oder erhöhte Haptoglobinwerte eine extravasale Hämolyse mit Sicherheit nicht ausschließen. Ferner waren bei keinem

Pat.[1]	SGOT mU/ml	SGPT mU/ml	Hpt.[2] mg%	ges.Bili.[3] mg%
No.Jö.	10	8	213	0,6
Bu.An. I	19	8	51	0,9
Bu.An. II	33	24	107	0,5
Re.Ma.	6	3	245	0,3
La.To.	3	3	294	-
Me.Ka.	17	6	64	0,1
Bu.Li.	3	7	-	0,4
Kl.Ma.	9	4	287	0,5
$\bar{x}$	12,5	7,9	180,1	0,5
s	10,2	6,8	104,3	0,2

Tab. 11a: Laborwerte der untersuchten Patienten.
1) Von einem Patienten liegen keine Werte vor.
2) Haptoglobin (Normalwert (Mittelwert $\pm$ 2s): 25 - 150 mg%), bestimmt im Eiweiß-Labor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Doz. Dr. Aly).
3) Gesamt-Bilirubin

der Patienten die Serum-Bilirubinwerte erhöht. Anhaltspunkte für hämolytische Vorgänge, die zu einem Anstieg von LDH-I und LDH-II im Blutserum führen könnten, finden sich somit in keinem der Fälle.

b.) Leber: Serum-Bilirubin, SGOT und SGPT liegen abgesehen von Patient Bu. An. II, der eine leichte Transaminasenerhöhung aufweist, im Normbereich. Bei diesem

Patienten, der einen Tag später verstarb, fand man bei der Sektion die Sinusoide der Leber angefüllt mit unreifen Vorstufen und dichte leukämische Infiltrate in den periportalen Feldern. Ferner bestand eine groß- bis mitteltropfige Leberepithelverfettung. Durch diesen Befund läßt sich die Transaminasenerhöhung bei diesem Patienten erklären, die allerdings so gering ist, daß bei ihr kaum eine merkliche Erhöhung der Leber-LDH im Blutserum zu erwarten ist, was durch die niedrige SLDH-V bei diesem Falle unterstrichen wird (siehe Tabelle 6). Bei den übrigen Patienten schließen die Befunde floride Leberparenchymschäden, die zu einer SLDH-Erhöhung führen könnten, mit großer Wahrscheinlichkeit aus. Eine Beeinflussung des Isoenzymverteilungsmusters des Serums durch aus der Leber stammende LDH-V ist somit bei den untersuchten Patienten nicht anzunehmen.

c.) Myocard: Die Elektrokardiogramme der untersuchten Patienten zeigen zwar häufig Erregungsrückbildungsstörungen, für Infarkte ergeben sich aber weder aus den Einzelelektrokardiogrammen noch aus den Verlaufsbeobachtungen der Elektrokardiogramme Anhaltspunkte. Auch die SGOT liegt mit Ausnahme des Patienten Bu. An. II, dessen leichte Transaminasenerhöhung auf eine Schädigung der Leber durch leukämische Infiltrate zurückgeführt werden muß, durchweg im Normbereich. Eine Abgabe von LDH-I und LDH-II aus dem Myocard an das Blutserum kann bei den Patienten folglich mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden.

5. Untersuchungen über den Abfall erhöhter SLDH-Aktivitäten nach Myocardinfarkten und akuten Leberparenchymschäden.

Die einzelnen Isoenzyme der LDH werden bei Tieren verschieden schnell aus dem Blutserum eliminiert (14, 56). In Hinsicht auf die Fragestellung der Arbeit soll daher untersucht werden, ob derartige Verhältnisse auch beim Menschen angenommen werden können.

Die Abfallgeschwindigkeiten erhöhter SLDH-Aktivitäten nach Myocardinfarkten und akuten Leberparenchymschäden (Fälle von Knollenblätterpilzvergiftung und paroxysmaler Tachycardie mit Regularisierung durch Cardioversion) wurden bei folgenden Patienten der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen miteinander verglichen:

Patienten mit Myocardinfarkt:

Nr.	Kr.-Bl.-Nr.[1)]	Pat.
1	12 733	Ho. Os.
2	13 884	La. An.
3	21 724	Ro. Ge.
4	21 879	Wi. He.
5	21 944	Ni. Ko.
6	22 121	Fr. Ot.
7	22 428	Sc. Eu.
8	24 006	Se. Ad.
9	28 814	Vo. Fr.

Patienten mit paroxysmaler Tachycardie mit Regularisierung durch Cardioversion:

Nr.	Kr.-Bl.-Nr.	Pat.
1	20 674	He. Ka.
2	24 454	Bi. Ma.

1) Kranken-Blatt-Nummern

Patienten mit Knollenblätterpilzvergiftung:

Nr.	Kr.-Bl.-Nr.	Pat.
1	12 609	Pi. Se.
2	12 614	Ca. Co.
3	12 627	Ta. Sa.
4	12 631	Va. Hi.

Bekanntlich sind nach Herzinfarkten die Isoenzyme LDH-I und LDH-II und nach Leberparenchymschäden das Isoenzym LDH-V erhöht. Es wurden nur solche Fälle herangezogen, deren SLDH über 500 mU/ml angestiegen war, und die keine Komplikationen (Reinfarkte und dgl.) aufwiesen. Eine Auswahl nach anderen Kriterien erfolgte nicht.

Da sich die erhöhte Gesamtaktivität der SLDH aus der normalen und einer zusätzlichen Aktivität zusammensetzt, der Aktivitätsabfall aber auf letztere beschränkt ist, wurde von der Gesamtaktivität der SLDH jeweils der mittlere Normalwert von 168 mU/ml subtrahiert, um die Aktivität der zusätzlichen LDH zu erhalten. Der in einer Verlaufsbeobachtung bei einem Patienten so erhaltene höchste Wert wurde gleich 100% gesetzt, und die nachfolgenden Werte darauf bezogen. Der Beobachtungszeitraum betrug maximal sechs Tage. Sobald die Gesamtaktivität unter den obersten Normalwert von 240 mU/ml abgesunken war, wurden die folgenden Werte nicht mehr berücksichtigt. Die Fälle mit einem SLDH-Typ B (Leberparenchymschäden) zeigten einen so raschen Abfall, daß die Serumaktivitäten bereits 48 h, nachdem der Höchstwert erreicht worden war, wieder im Normbereich lagen, so daß hier nur die 24 h-Werte herangezogen werden konnten.

In Abbildung 13 sind die Resultate im semilogarithmischen Maßstab aufgetragen. Da der Abfall erhöhter Serumenzymaktivitäten nach der Formel $a_t = a_o \times e^{-k \times t}$ erfolgt (4, 14) (a_o = Aktivität zum Zeitpunkt t_o, a_t = Aktivität zum Zeitpunkt t, k = Eliminationskonstante,

t = Zeit, e = 2,718..), sind die Steigungen der eingezeichneten Geraden proportional den Eliminationskonstanten. Danach fällt die SLDH nach akuten Leberparenchymschäden sieben- bis achtmal schneller ab als nach Myocardinfarkten (Halbwertszeit der Herz-LDH: 59 h, Halbwertszeit der Leber-LDH: 8 h).

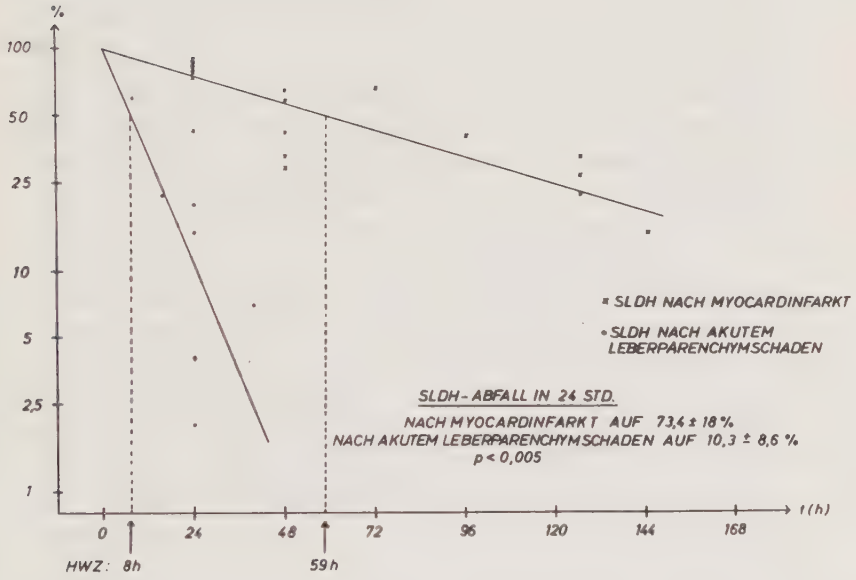

Abb. 13: Abfall erhöhter SLDH-Aktivitäten nach Myocardinfarkten bzw. akuten Leberparenchymschäden (Knollenblätterpilzvergiftung bzw. paroxysmale Tachycardie mit Regularisierung durch Cardioversion).

Der Vergleich der 24 h-Werte (Herz-LDH: Abfall auf 73,4 $\pm$ 18,0% der Ausgangsaktivität, Leber-LDH: Abfall auf 10,3 $\pm$ 8,6%) mit Hilfe des t-Testes für den Vergleich der Mittelwerte unabhängiger Meßreihen ergab, daß die Aktivitäten der SLDH nach Myocardinfarkten und nach akuten Leberparenchymschäden hochsignifikant unterschiedlich rasch abfallen ($p < 0{,}0005$).

D. Diskussion der Ergebnisse.

1. Zum Serummuster der LDH-Isoenzyme bei akuten Paraleukoblastosen.

Die gefundenen Isoenzymverteilungsmuster der LDH im Serum von Patienten mit akuter Leukose stimmen mit den von anderen Autoren (49, 104, 115) gefundenen Werten überein und entsprechen somit dem Verteilungstyp, der bevorzugt bei Malignomträgern auftritt (Typ C).

Die Frage, in wieweit die mit der angewandten Methode erhaltenen Ergebnisse das tatsächliche Verteilungsmuster wiedergeben, wurde im Methodikteil der Arbeit erörtert. Danach spielt als einziger Unsicherheitsfaktor der durch die "nothing dehydrogenase" hervorgerufene Fehler eine gewisse Rolle, da es nicht möglich ist, ihn auf befriedigende Weise auszuschalten. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die durch die "nothing dehydrogenase" hervorgerufenen Abweichungen bei erhöhter SLDH-Aktivität gering sind. Zwar dürfte der wahre Wert der LDH-I bei den untersuchten Fällen um drei bis vier Prozentwerte niedriger liegen, doch läßt sich dadurch in keinem Fall die fehlende Übereinstimmung der Isoenzymverteilungsmuster der zusätzlichen SLDH und der LDH der Paraleukoblasten erklären.

Bereits WAKIM (89) hat darauf hingewiesen, daß im Serum keine Stoffe vorhanden sind, welche Enzyme in ihrer Aktivität hemmen können. In den vorliegenden Untersuchungen wurde darüber hinaus gezeigt, daß kein Anhaltspunkt dafür besteht, daß derartige Substanzen bestimmte Isoenzyme der LDH selektiv inaktivieren.

Die zusätzlich ausgewerteten Labordaten (Haptoglobin, Bilirubin, SGOT, SGPT) und Elektrokardiogramme lassen keine Rückschlüsse auf eine Herkunft der erhöhten SLDH der Leukosepatienten aus Erythrozyten, Herz und Leber

zu. Auch andere Autoren (88, 92, 106) konnten bei Patienten mit malignen Tumoren und Leukosen keine Erhöhung der Aktivität der Serumtransaminasen finden, sofern nicht ein Organ durch das Tumorwachstum direkt in Mitleidenschaft gezogen wurde.

Die Erhöhung der Aktivität der SLDH und das Auftreten des spezifischen Isoenzymverteilungsmusters bei den untersuchten Patienten müssen daher in einem direkten Zusammenhang mit der Grunderkrankung gesehen werden und lassen sich nach den vorliegenden Befunden nicht auf sekundäre Organschädigungen oder hämolytische Vorgänge zurückführen.

2. Zum Verteilungsmuster der Isoenzyme der LDH in Paraleukoblasten.

Die Verteilung der Isoenzyme der LDH in Paraleukoblasten bei akuter Leukose wurde bereits von anderen Autoren (5, 20, 45, 83, 104) untersucht. Auch sie fanden das Aktivitätsmaximum in der Regel in der Fraktion LDH-III, doch streuen die Angaben der Prozentwerte erheblich. Dies dürfte weniger auf die unterschiedlichen Methoden als vielmehr auf die Verschiedenartigkeit der Isoenzymverteilungsmuster der Paraleukoblasten bei den einzelnen Patienten zurückzuführen sein.

Darüber hinaus ist eine Verunreinigung der Paraleukoblasten-Präparationen durch nicht leukämisch veränderte reife Zellen als Ursache zu diskutieren. Eine entscheidende Beeinflussung der Höhe der Fraktionen LDH-II bzw. LDH-V infolge Verunreinigung der isolierten Paraleukoblasten durch reife Granulozyten bzw. Lymphozyten konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch statistisch ausgeschlossen werden. Es muß daher angenommen werden, daß die ermittelten Werte weitgehend die tatsächliche Isoenzymverteilung in den Paraleukoblasten wiedergeben.

3. Zu dem Ergebnis der Inkubationsversuche.

Die Größe des Verlustes von LDH-Aktivität an das Inkubationsmedium durch die inkubierten Paraleukoblasten (1% der Aktivität der Paraleukoblasten/h) stimmt mit den von ENGELHARDT et al. (26) bei Granulozyten ermittelten Werten überein.

Da es sich bei diesen Experimenten um unphysiologische Bedingungen handelte, können die Ergebnisse nur dahingehend interpretiert werden, daß kein Hinweis dafür vorliegt, daß die untersuchten Paraleukoblasten bestimmte LDH-Isoenzyme bevorzugt abgeben. Die Frage, in welchem Ausmaße von diesen Zellen LDH an das Blutplasma abgegeben wird, sollte mit diesen Versuchen nicht untersucht werden.

4. Zur Frage unterschiedlicher Eliminationsgeschwindigkeiten der LDH-Isoenzyme aus dem Blutserum beim Menschen.

Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, daß nach intravenöser Applikation von Enzymen deren Aktivitätsabfall im Serum in zwei Phasen erfolgt (2, 4, 14, 60):

1. Phase: Verteilung des intravenös verabreichten Enzymes durch Diffusion zwischen Intra- und Extravasalraum bis zur Herstellung eines Gleichgewichtzustandes (4).
2. Phase: Aktive Elimination des Enzymes, vermutlich durch Abbau des Fermentproteins im RES (89). Nach Untersuchungen von BOYD (14) tritt eine nennenswerte passive Inaktivierung der LDH durch "Alterung" des Enzymmoleküls nur bei dem empfindlichen Isoenzym LDH-V ein. Vergleichsweise zur aktiven Elimination ist der durch sie hervorgerufene Aktivitätsabfall jedoch gering (Halbwertszeit der passiven Inaktivierung der LDH-V beim Schaf: 48 h, Halbwertszeit der aktiven Elimination der LDH-V beim Schaf: 8 h) (14). Der Enzymaktivitätsabfall sowohl der ersten als auch der zweiten Phase folgt den Gesetzen einer Exponentialfunktion (2, 4, 14).

Bei Beobachtungen des Abfalles erhöhter Serumenzymaktivitäten nach Organschädigungen wird die erste Phase der Diffusion im allgemeinen nicht erfaßt. Die hier beobachteten Werte entsprechen denen der zweiten Phase, d. h. der aktiven Enzymelimination (14). Es ist demnach prinzipiell möglich, aus dem Abfall erhöhter Serumenzyme nach zeitlich begrenzter Organschädigung die Geschwindigkeit der aktiven Elimination dieser Enzyme aus dem Blutserum annähernd zu berechnen, zumal auch aus Angaben von REICHARD (74) hervorgeht, daß im Tierversuch der Abfall erhöhter Serumtransaminasen nach Leberparenschädigung durch Tetrachlorkohlenstoffvergiftung weitgehend wie der Abfall der intravenös applizierten Enzyme erfolgt.

Die Tatsache, daß beim Menschen die erhöhte SLDH-Aktivität nach akuten Leberparenchymschäden weit rascher zur Norm abfällt als nach Myocardinfarkten, steht außer Frage. Entsprechende Resultate können den Berichten anderer Autoren entnommen werden und stimmen größenordnungsmäßig mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunden überein (siehe Tabelle 12). Bei diesem Vergleich der SLDH-Halbwertszeiten ist nun allerdings nicht auszuschließen, daß die längere Halbwertszeit der Herz-LDH gegenüber der Leber-LDH auf einen verzögerten Enzymeinstrom aus den ischämischen Nekroseherden des Myocards ins Serum zurückzuführen ist. Dagegen spricht jedoch, daß die übrigen nach Myocardinfarkten erhöhten Serumenzymaktivitäten weit rascher zur Norm zurückkehren als die LDH, deren lang anhaltende Aktivitätserhöhung im Serum zur Spätdiagnostik des Myocardinfarktes herangezogen wird (39). Ferner hat GRÖNVALL (33) für die Halbwertszeit der Erythrozyten-LDH (Erythrozyten enthalten nach (68) wie Herzmuskulatur vorwiegend LDH-I und LDH-II) einen Wert errechnet, der im Größenbereich der Halbwertszeit der Herz-LDH liegt.

	LDH-I[1)]	LDH-V[1)]	Methode
BOYD (14)	48	8	i.v. Applikation (Lämmer)
	48,6	7,4	Aktivitätsabfall nach Vit.E-Behandlung bei Muskeldystrophie (Schafe)
Klinische Beobachtungen (Mensch):			
AMELUNG (zit. nach 39)		14,4	Aktivitätsabfall nach CCl_4-Intoxikation
BÜCHER et al. (16)	36		Aktivitätsabfall nach Myocardinfarkt
GRÖNVALL (33)	72(Maximalwert)		Aktivitätsabfall nach Vit.B_{12}-Therapie bei perniziöser Anämie
eigene Untersuchungen		8	Aktivitätsabfall nach akutem Leberparenchymschaden
	59		Aktivitätsabfall nach Myocardinfarkt

Tab. 12: Zusammenstellung der in der Literatur mitgeteilten Halbwertszeiten der LDH im Blutserum in der Phase der aktiven Enzymelimination. Die Werte der klinischen Beobachtungen geben die Halbwertszeiten von Isoenzymverteilungen mit Dominanz der Fraktionen LDH-I bzw. LDH-V, jedoch nicht der reinen Isoenzyme wieder.

1) LDH-Halbwertszeiten, Angabe der Werte in Stunden

Im Zusammenhang mit den Resultaten der Tierversuche (14, 56) gewinnt somit die Hypothese an Wahrscheinlichkeit, daß auch beim Menschen die zur Anode wandernden Isoenzyme der LDH langsamer aus dem Blutserum eliminiert werden als die kathodisch wandernden. Die in Tabelle 12 aus den klinischen Beobachtungen gewonnen Werte geben jedoch nur die Halbwertszeiten der Serumaktivitäten von Isoenzymverteilungen mit Überwiegen der LDH-I bzw. der LDH-V, nicht die von reinen Isoenzymfraktionen wieder. Demnach müßten die Halbwertszeiten der Isoenzyme LDH-I und LDH-V über bzw. unter den angegebenen Werten liegen. Schlüssige Beweise für die Richtigkeit dieser Hypothese, die nur durch Bestimmung der Halbwertszeiten der Isoenzyme der LDH nach ihrer intravenösen Applikation beim Menschen erbracht werden könnten, stehen allerdings noch aus.

5. Abschließende Betrachtung über die Entstehung des tumorspezifischen Verteilungsmusters der Isoenzyme der SLDH bei Patienten mit akuter Paraleukoblastose.

Einen Überblick über die möglichen Wege der LDH im extrazellulären Raum bei Tumorpatienten gibt Abbildung 14. Danach ist die Höhe der aktuellen Enzymaktivität im Serum die Resultierende aus Enzymeinstrom und Enzymabbau. Zwei Mechanismen können somit prinzipiell zu einer Erhöhung der Aktivität der SLDH führen (44):

1.) Ein verminderter Abbau (clearance) der SLDH: Die SLDH wird wie andere Serumenzyme (SGOT, SGPT) aktiv im reticuloendothelialen System (RES) abgebaut (55, 89). Durch Blockade des RES mit dem Lipopolysaccharid Zymosan oder anderen Substanzen kann im Tierversuch der Serumspiegel dieser Enzyme erhöht (55), oder die Halbwertszeit intravenös zugeführter Enzymaktivitäten verlängert werden (89).

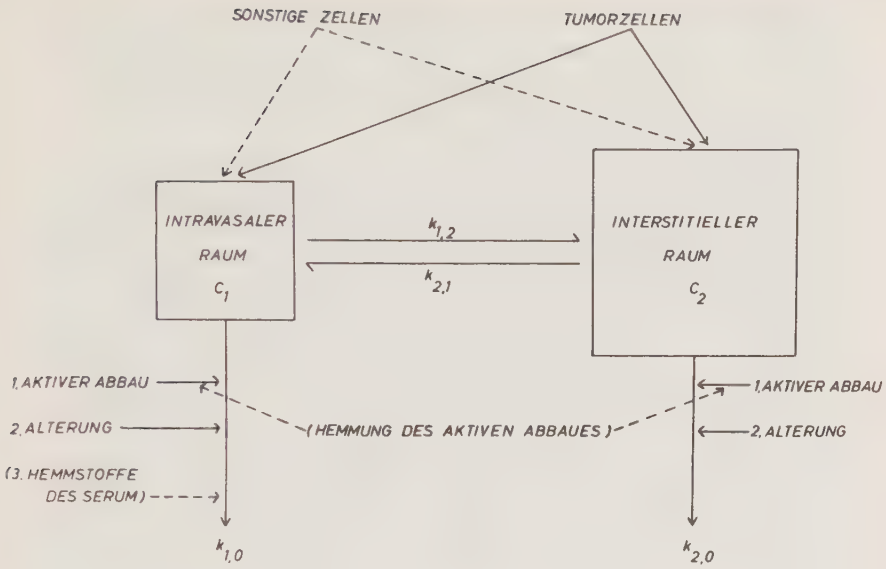

Abb. 14: Wege der LDH im extrazellulären Raum bei Tumor-Patienten. $k_{1,0}$ und $k_{2,0}$ = Eliminationskonstanten. $k_{1,2}$ und $k_{2,1}$ = Verteilungskonstanten. c_1 und c_2 = Enzymaktivitäten. Modifiziertes Schema nach BOYD (14).

Das von Riley entdeckte sogenannte LDH-Virus (64, 79, 80), das viele Mäusetransplantationstumoren verunreinigt, ohne selbst ein Tumorvirus zu sein (111), führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Aktivität der SLDH und anderer Serumenzyme durch eine Herabsetzung der Clearance dieser Enzyme (7, 65)infolge Blockade des RES (55). Bei Menschen mit erhöhter SLDH-Aktivität konnte ein solches Virus jedoch nicht nachgewiesen werden (19).

Tumortragende Ratten, die nicht mit dem LDH-Virus infiziert sind, weisen nach KAMPSCHMIDT et al.(44) ebenfalls eine verminderte Clearance intravenös zugeführter LDH auf Grund einer bei diesen Tieren beeinträchtigten Funktion des RES auf.

Nach diesen Befunden ist es zwar berechtigt, eine verminderte Clearance der SLDH als Ursache der Aktivitätserhöhung der SLDH bei den untersuchten Leukosepatienten in Betracht zu ziehen. Die fehlende Erhöhung anderer Enzyme, die ebenfalls im RES abgebaut werden (z. B. SGOT, SGPT), weist jedoch darauf hin, daß der entscheidende Faktor der Aktivitätszunahme der SLDH in einem vermehrten Angebot von LDH an das Blutserum zu suchen ist.

2.) Ein verstärkter Einstrom von LDH in das Blutserum: Die vermehrt abgegebene LDH kann stammen aus:

a.) tumorös veränderten Zellen
b.) anderen Zellen, die durch das Tumorwachstum geschädigt werden.

Die vorliegenden Untersuchungen an Patienten mit akuter Paraleukoblastose zeigen, daß die Herkunft der erhöhten SLDH-Aktivität aus nicht tumorös veränderten Zellen weitgehend ausgeschlossen werden kann, da eine Schädigung LDH-reicher Organe oder Zellen, die zu einer Zunahme der LDH-Aktivität im Serum führen könnte, nicht nachzuweisen ist. Daher muß gefolgert werden, daß die erhöhte SLDH aus den Tumorzellen, d. h. aus den Paraleukoblasten stammt. Dafür spricht ferner auch der Befund eine Steigerung der Aldolase-Aktivität im Serum der meisten untersuchten Patienten (bei sieben der zehn untersuchten Fälle), da die Aldolase wie die LDH eines der Glykolyseenzyme darstellt, mit denen Tumorzellen reichlich ausgestattet zu sein pflegen (39).

Die erhöhte LDH-Aktivität des Serums könnte nun entweder von

a.) abgestorbenen oder
b.) lebenden Paraleukoblasten

abgegeben werden. Nach FLIEDNER (27) beträgt die Umsatzzeit der Blasten im Blute 16 Tage, d. h. daß pro Tag 6% der Blastenpopulation des Blutes abgebaut werden. Abgesehen von dem Umsatz der Blasten im Knochenmark und in anderen Organen muß allein hieraus ein erheblicher Anstieg der SLDH-Aktivität resultieren.

Darüber hinaus geben wahrscheinlich auch lebende Tumorzellen LDH und andere Enzyme ab. In Tumorzellkulturen steigt die LDH-Aktivität des Kulturmediums stark an, sobald sich die Zellen zu teilen beginnen. Dies wird von MOORE et al. (61) darauf zurückgeführt, daß die Zellen bei ihrer Teilung Enzyme verlieren. Auch dieser Befund könnte den Aktivitätsanstieg der LDH und anderer Enzyme der Glykolyse im Serum (39) bei proliferativen Erkrankungen deuten.

Ob Tumorzellen in vivo Enzyme durch die intakte Zellmembran abgeben, ist nicht geklärt. Jedenfalls geben in vitro inkubierte Tumorzellen mehr Enzyme (auch LDH) als benigne Zellen an das umgebende Medium ab, was nicht auf einen gesteigerten Zerfall der Tumorzellen zurückgeführt werden kann (34, 41). Dieser Befund wurde auch als aktive Leistung der Tumorzellen gedeutet und mit ihrer Eigenschaft zu destruktivem und infiltrativem Wachstum in Zusammenhang gebracht (41).

Der Vergleich der Isoenzymmuster der LDH der Paraleukoblasten und der zusätzlichen Serum-LDH hat nun aber ergeben, daß sich die beiden Verteilungen in der Weise statistisch signifikant unterscheiden, wie dies bereits von BOTTOMLEY et al. (13) berichtet wurde. Auch die andere Beobachtung, daß trotz des häufigen Vorkommens maligner Tumoren mit Maximum der LDH-Aktivität in den Frak-

tionen LDH-IV und LDH-V nie ein entsprechender Verteilungstyp im Serum von Malignomträgern auftritt (29), steht im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen.

Nachdem methodische Fehler und andere Herkunftsorte der erhöhten SLDH weitgehend ausgeschlossen werden konnten, bleiben nur noch zwei Möglichkeiten zur Erklärung dieser Diskrepanz offen:

a.) Die Paraleukoblasten geben bestimmte Isoenzyme der LDH bevorzugt ab: Hierfür erbrachten die Inkubationsversuche keine Anhaltspunkte.

b.) Das von den Paraleukoblasten abgegebene Isoenzymmuster erfährt im Serum eine sekundäre Veränderung: Da Substanzen, die bestimmte Isoenzyme der LDH im Serum selektiv inaktivieren, nicht nachgewiesen werden konnten, gewinnt die Hypothese, daß auch beim Menschen die Isoenzyme der SLDH unterschiedlich schnell aus dem Blutserum eliminiert werden, für die dargelegten Ergebnisse an Bedeutung. Unter der Annahme dieser Hypothese läßt sich die Entstehung des tumorspezifischen Verteilungsmusters der LDH-Isoenzyme im Serum der untersuchten Leukosepatienten erklären. In ihrem Serum wurde konstant relativ zur Isoenzymverteilung in den Paraleukoblasten zuviel von den anodisch (LDH-I und LDH-II) und zuwenig von den kathodisch (LDH-III, LDH-IV und LDH-V) wandernden Isoenzymen gefunden (siehe Abbildung 12). Letztere sollen andererseits im Serum schneller abgebaut werden als erstere.

Es soll nun abschließend untersucht werden, ob sich die Hypothese, die von den Paraleukoblasten abgegebenen LDH-Isoenzyme würden im Serum durch unterschiedlich rasche Elimination in ihrer Zusammensetzung verändert,auch quantitativ verifizieren läßt. Hierzu soll unter der Annahme dieser Hypothese als alleiniger Ursache der Divergenz der Isoenzymmuster in Serum und Paraleukoblasten versucht werden, die relativen Eliminationskonstanten

der einzelnen Isoenzyme im Serum größenordnungsmäßig zu bestimmen, um sie mit den für Herz- und Leber-LDH ermittelten Halbwertszeiten und den Resultaten der Tierversuche zu vergleichen.

Der Abfall erhöhter Serumenzymaktivitäten erfolgt nach AMELUNG (4) und BOYD (14) nach folgender Formel: $a_t = a_o \times e^{-k \times t}$ (a_t = Aktivität zum Zeitpunkt t, a_o = Aktivität zum Zeitpunkt t = 0, t = Zeit, k = Eliminationskonstante, e = 2, 710..). Somit beträgt die Aktivitätsänderung da/dt zum Zeitpunkt t $da/dt = a_o \times k \times e^{-k \times t}$ und zum Zeitpunkt t = 0 $da/dt = a_o \times k$. Unter der Annahme eines Fließgleichgewichtes, d. h. eines konstanten Enzymspiegels im Serum, muß die Abbaugröße da/dt gleich dem Enzymeinstrom S ins Serum sein (S = Aktivität, die pro Zeiteinheit dt in das Serum einströmt): $S = a \times k$. Kennt man die Größen S und a, so läßt sich die Eliminationskonstante k berechnen, sofern ein Fließgleichgewicht besteht : $k = S/a$.

Wendet man diese Formel zur Berechnung der relativen Eliminationskonstanten der LDH-Isoenzyme bei den untersuchten Patienten an, so ergibt sich unter den erwähnten Voraussetzungen, Vorliegen eines Fließgleichgewichtes mit konstantem Enzymspiegel im Serum und unterschiedliche Eliminationsraten als alleinige Ursache für die Diskrepanz der Isoenzymverteilungsmuster in Leukozyten und zusätzlicher SLDH, für das Isoenzym n mit den Aktivitätsanteilen $c_{L,n}$ in den Leukozyten und $c_{S,n}$ im Blutserum folgender Zusammenhang (k_n = Eliminationskonstante des Isoenzyms n, S = Aktivitätseinstrom ins Serum/Zeiteinheit, a = Aktivität der zusätzlichen SLDH):

$$k_n = \frac{S}{a} \times \frac{c_{L,n}}{c_{S,n}}$$

Da S und a bei einem Patienten für alle fünf Isoenzyme

konstante Werte sind, ist der Quotient Aktivitätsanteil eines Isoenzymes in den Leukozyten/Aktivitätsanteil desselben Isoenzyms an der zusätzlichen SLDH proportional k_n, d. h. die Relation der Eliminationskonstanten zueinander kann auf diese Weise bestimmt werden.

Die bei allen untersuchten Patienten errechneten Quotienten zeigen eine generelle Übereinstimmung in ihrer Größenzunahme von der LDH-I zur LDH-V (siehe Tabelle VII), die, wie die Prüfung mit dem Konkordanzkoeffizienten von Kendall ergab, kaum zufallsbedingt sein kann ($p<0,01$). Die Quotienten weisen im Mittel folgende Relationen auf: $k_2 : k_3 : k_4 = 1 : 3,1 : 7,9$. Die Werte für k_1 und k_5 sind kleiner als k_2 bzw. größer als k_4, doch streuen sie stärker, was auf die geringe Aktivität der Isoenzymfraktionen LDH-I in den Leukozyten und LDH-V im Serum und den damit größeren relativen Fehler (großer Variationskoeffizient bei kleinen Fraktionen) zurückzuführen ist. Auf ihre Zahlenangabe wird deshalb verzichtet.

Nach den vorliegenden Berechnungen muß also das Isoenzym LDH-IV 7,9 mal schneller aus dem Blutserum eliminiert werden als das Isoenzym LDH-II, sofern die beobachtete Diskrepanz der Isoenzymverteilungsmuster in Serum und Paraleukoblasten allein durch unterschiedliche Eliminationsraten der einzelnen LDH-Isoenzyme bedingt ist. Das Verhältnis $k_5 : k_1$ muß demnach größer als 7,9 sein. BOYD (14) fand vergleichsweise bei Schafen folgendes Verhältnis: $k_1 : k_5 = 1 : 7,5 - 15$. Nach den eigenen Berechnungen fällt die SLDH nach akuten Leberparenchymschäden sieben-bis achtmal schneller ab als nach Myocardinfarkten. Sofern dieser Unterschied durch differente Eliminationsraten zustande kommt, muß hier das Verhältnis $k_5 : k_1$ größer als sieben bis acht sein, da die zur Berechnung dieses Quotienten zugrundegelegten Eliminationskonstanten von Herz- und Leber-LDH nicht die Werte reiner Isoenzymfraktionen repräsentieren.

Alle diese errechneten Daten können keinen Anspruch auf Exaktheit erheben. Doch stimmen sie größenordnungsmäßig miteinander und den Angaben BOYD's (14) überein , zumal wenn man berücksichtigt, daß das Verhältnis $k_5 : k_1 > 7{,}9 : 1$ infolge des durch die "nothing dehydrogenase" verursachten Fehlers etwas zu hoch ausgefallen sein dürfte, und die Voraussetzung eines Fließgleichgewichtes, d. h. eines konstanten Serumenzymspiegels, bei den untersuchten Patienten nur annähernd gegeben war.

Es kann somit die Hypothese aufrecht erhalten werden, daß die Aktivitätserhöhung der SLDH bei den untersuchten Patienten durch Verlust von LDH aus den Paraleukoblasten zustande kommt, und die Divergenz der Isoenzymverteilungsmuster der LDH in Serum und Paraleukoblasten durch unterschiedliche Eliminationsgeschwindigkeiten der einzelnen Isoenzyme bedingt ist.

Derartige Verschiebungen in der Verteilung der LDH-Isoenzyme müssen dann immer erwartet werden, wenn LDH mit einem Isoenzymmuster in das Serum einströmt, in dem nicht ein oder zwei benachbarte Isoenzyme dominieren (z. B. Herz, Erythrozyten, Leber), sondern die Fraktionen gleichmäßiger verteilt sind (z. B. Paraleukoblasten, Tumoren). In diesem Sinne ließe sich dann auch die Entstehung des tumorspezifischen Verteilungsmusters der Isoenzyme der Lactatdehydrogenase bei anderen Malignomen deuten. Diese an einem dynamischen Modell orientierte Betrachtungsweise könnte auch für die Klärung der Genese von Isoenzymverteilungsmustern anderer Fermente von Bedeutung sein.

E. Zusammenfassung.

1. Die angewandte Methode zur Bestimmung der relativen Verteilung der LDH-Isoenzyme liefert die exaktesten Ergebnisse, wenn bei einer Färbedauer von 85 min die Aktivität keiner der Isoenzymfraktionen 20 mU übersteigt, eine Bedingung, die im allgemeinen erfüllt ist, wenn die zur Elektrophorese aufgetragene Aktivität aller Isoenzyme 35 - 40 mU nicht übersteigt.

2. Unter diesen Bedingungen beträgt bei Zytolysaten die Fehlerbreite der Einzelbestimmung des Aktivitätsanteiles einer Isoenzymfraktion weniger als ± 10%.

3. Bei der Bestimmung der LDH-Isoenzymverteilung in Seren mit Hilfe dieser Methode tritt infolge der "nothing dehydrogenase" zusätzlich ein richtungsgebundener Fehler auf, auf Grund dessen bei Seren mit erhöhter LDH-Aktivität (über 240 mU/ml) der ermittelte Anteil der Fraktion LDH-I um drei bis vier Prozentwerte zu hoch ausfällt. Dieser Fehler ist bei Seren mit normaler Enzymaktivität noch größer.

4. Bei acht Patienten mit akuter Paraleukoblastose wurden insgesamt zehnmal die Aktivität der SLDH und die Verteilung ihrer Isoenzyme bestimmt. Alle Patinten weisen eine Aktivitätssteigerung der SLDH auf, die zum Auftreten eines Verteilungstyps der LDH-Isoenzyme führt, der nach Untersuchungen anderer Autoren sehr charakteristisch für das Vorliegen eines Malignomes sein soll. Gegenüber dem Verteilungsmuster in Normalseren ist der prozentuale Anteil der Isoenzyme LDH-III und LDH-IV an der Gesamtaktivität erhöht, während der Anteil der Isoenzyme LDH-I und LDH-V absinkt. Die Stärke der Fraktion LDH-II bleibt praktisch relativ unverändert. Absolut betrachtet ist die Aktivität aller fünf Fraktionen erhöht.

5. In den Paraleukoblasten derselben Patienten findet man ein Überwiegen der Fraktionen LDH-II, LDH-III und

LDH-IV, wobei die LDH-III in der Regel die stärkste Fraktion darstellt.

6. Die Verteilungsmuster der zusätzlich im Serum der Patienten auftretenden LDH und der LDH der Paraleukoblasten unterscheiden sich signifikant in der Weise, daß der Anteil der Isoenzyme LDH-I und LDH-II im Serum relativ zu groß und der Anteil der Fraktionen LDH-III, LDH-IV und LDH-V relativ zu niedrig ist.

7. Folgende Ursachen für diese Diskrepanz konnten weitgehend ausgeschlossen werden:
a.) In einer Glucose-Ringer-Phosphatpuffer-Lösung inkubierte Paraleukoblasten verlieren 1% ihrer LDH-Aktivität pro Stunde. Die von den inkubierten Zellen abgegebene LDH und die LDH in den Zellen weisen dasselbe Verteilungsmuster auf, d. h. es werden keine Isoenzyme bevorzugt von den Paraleukoblasten abgegeben.
b.) Es konnte nicht nachgewiesen werden, daß bestimmte Isoenzyme der LDH durch Serumbestandteile selektiv inaktiviert werden.
c.) Es liegen keine Anhaltspunkte vor, daß die erhöhte LDH-Aktivität im Serum der untersuchten Patienten aus LDH-reichen Organen und Zellen wie Herz, Leber oder Erythrozyten stammt.

8. Erhöhte SLDH-Aktivität fällt nach akuten Leberparenchymschäden sieben- bis achtmal schneller zur Norm ab als nach Myocardinfarkten. Als Ursache hierfür kommen in erster Linie unterschiedliche Eliminationsgeschwindigkeiten der einzelnen LDH-Isoenzyme im Serum in Frage, und zwar dürfte die LDH-I am langsamsten und die LDH-V am schnellsten abgebaut werden.

9. Unter der Annahme unterschiedlicher Eliminationsraten für die einzelnen LDH-Isoenzyme läßt sich die Diskrepanz der Isoenzymverteilungsmuster in Serum und Paraleukoblasten bei den untersuchten Patienten mit akuter Paraleukoblastose erklären: Die SLDH-Aktivitätserhöhung

kommt durch Abgabe von LDH aus den leukämisch veränderten Blutzellen zustande, jedoch wird durch die unterschiedlichen Eliminationsgeschwindigkeiten der einzelnen Isoenzyme deren Verteilung im Serum verändert.

Anhang: Tabellen zur Statistik.

n	x AKT (mU)	y FM (E)
1	1,0	2,0
2	1,75	2,75
3	2,0	2,25
4	3,1	3,5
5	3,5	5,5
6	3,9	5,5
7	8,4	10,5
8	10,5	12,25
9	11,3	14,75
10	13,9	15,6

Tab. I: Färbeaktivität des Isoenzymes LDH-I: die von den jeweiligen Aktivitäten (x) des Enzyms in 90 min gebildete Farbstoffmengen. (AKT = Aktivität in mU, FM = gebildete Farbstoffmenge in E = willkürliche Einheiten). (Zu S. 19ff).

n	x AKT (mU)	y FM (E)
1	1,0	1,75
2	1,75	2,75
3	2,0	2,25
4	2,9	3,75
5	3,5	4,5
6	5,7	8,75
7	7,0	9,0
8	10,5	14,25
9	109	14,5
10	14,0	15,4

Tab. II: Färbeaktivität des Isoenzyms LDH-V. Weitere Erklärungen s. Tab. I. (Zu S. 19ff).

Pat.-Nr.	Lym.[1]	LDH-II[2]	Gran.[1]	LDH-V[2]
1	4	22	9	15,5
2	10	15	1	19
3	0	8	2	10
4	1	15	1	21
5	2	34,5	0	1
6	0	25	10	9
7	14	20	1	5
8	4	19,5	1	16,5
9	4	23	12,5	15
10	11,5	23	5	15

Tab. III: Gegenüberstellung des Anteils von Lymphozyten bzw. Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl und der Stärke von LDH-II bzw. LDH-V in den Leukozytenpräparationen (zu S. 39f).
1) Werte der Lymphozyten und Granulozyten nach Tab. 9 auf S. 39.
2) Werte von LDH-II und LDH-V nach Tab. 8 auf S. 38.

Nr.	LDH-I		LDH-II		LDH-III		LDH-IV		LDH-V	
	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L
1	16,1	2,5	53,3	22,0	26,3	34,0	3,5	26,0	0,8	15,5
2	13,5	2,0	41,5	15,0	28,6	32,0	14,5	32,0	1,9	19,0
3	19,2	2,0	38,4	8,0	28,1	38,0	12,3	42,0	2,0	10,0
4	20,9	2,0	27,1	15,0	37,0	31,0	13,7	31,0	1,3	21,0
5	25,3	13,5	46,2	34,5	23,8	36,o	4,3	15,0	0,4	1,0
6	41,3	2,5	43,8	25,0	11,3	40,0	2,9	23,5	0,7	9,0
7	17,1	4,5	37,3	20,0	30,8	41,5	13,4	29,0	1,4	5,0
8	14,7	6,0	44,9	19,5	26,5	30,0	10,8	28,0	3,1	16,5
9	16,6	6,0	46,1	23,0	20,1	30,0	13,0	26,0	4,2	15,0
10	7,7	8,0	34,7	23,0	33,8	28,0	20,4	26,0	3,4	15,0

Tab. IV: Gegenüberstellung der Verteilung der Isoenzyme der LDH in den Leukozyten (=L, Werte nach Tab. 8) und in der zusätzlichen SLDH (=S, berechnet wie in dem Beispiel auf S. 41 angegeben) bei den untersuchten Patienten. Werte in Relativ-%. (Zu S. 40ff).

Nr.	Pat.	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1	Ho.Os.	940 (100%)	772 (79%)	-	-	-	-
2	La. An.	1052 (100%)	832 (79%)	-	-	-	-
3	Ro.Ge.	216 (100%)	-	91 (42%)	-	-	-
4	Wi.He.	707 (100%)	552 (78%)	407 (58%)	-	-	188 (27%)
5	Ni.Ko.	1272 (100%)	1127 (89%)	842 (66%)	-	520 (41%)	-
6	Fr.Ot.	612 (100%)	-	202 (33%)	-	-	-
7	Sc.En.	332 (100%)	-	282 (85%)	222 (67%)	-	110 (33%)
8	Se.Ad.	282 (100%)	-	82 (29%)	-	-	-
9	Vo.Fr.	862 (100%)	357 (42%)	-	-	-	-

Tab. V: Aktivitätsabfall der SLDH bei Patienten mit Myocardinfarkt. Der Zeitpunkt der höchsten gemessenen Serumaktivität wurde gleich 0 h gesetzt. Von allen Werten (Aktivitätsangabe in mU/ml) wurde der mittlere Normalwert von 168 mU/ml abgezogen, um den absoluten Aktivitätsanstieg zu erhalten. Der so für 0 h ermittelte Wert wurde gleich 100% gesetzt,und alle folgenden Werte darauf bezogen. (Zu S. 49ff).

Nr.	Pat.	0 h	8 h	16 h	24 h	40 h
1	Pi.Se.	422 (100%)	-	-	16 (4%)	-
2	Ca.Co.	457 (100%)	-	-	68 (15%)	-
3	Ta.Sa.	462 (100%)	-	-	94 (20%)	-
4	Va.Hi.	4052 (100%)	-	-	80 (2%)	-
5	He.Ka.	3732 (100%)	-	832 (22%)	-	277 (7%)
6	Bi.Ma.	231 (100%)	141 (61%)	-	-	-

Tab. VI: Aktivitätsabfall der LDH des Serums bei Patienten mit akutem Leberparenchymschaden infolge Knollenblätterpilzvergiftung (Nr. 1 - 4) bzw. paroxysmaler Tachycardie (Nr. 5 - 6). Angabe der Werte wie in Tab. V. (Zu S. 49ff).

Pat.	LDH-I	LDH-II	LDH-III	LDH-IV	LDH-V
1	0,155	0,413	1,293	7,429	19,375
2	0,148	0,361	1,111	2,207	10,000
3	0,104	0,208	1,352	3,415	5,000
4	0,096	0,555	0,837	2,363	16,154
5	0,533	0,747	1,513	3,488	2,500
6	0,061	0,571	3,540	8,103	12,857
7	0,263	0,536	1,347	2,164	3,571
8	0,408	0,434	1,132	2,593	5,322
9	0,361	0,499	1,492	2,000	3,571
10	1,039	0,663	0,828	1,275	4,412

Tab. VII: Quotienten aus Leukozyten-LDH (in Rel.-%)/ zusätzliche Serum-LDH (in Rel.-%) (zu S. 64).

F. Literaturverzeichnis

1. D'ADDABO, A. und D. KLAUS:
Untersuchungen über die ^{131}J-Markierung von Lactatdehydrogenase.
Acta Isotopica 1,39 (1961)

2. AMELUNG, D., H.D. HORN und E. SCHROEDER:
Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Frage der Fermentelimination aus dem Blutserum.
Klin. Wschr. 36, 963 (1958)

3. AMELUNG, D.:
Serum-Ferment-Bestimmungen bei perniziöser Anaemie.
Dtsch. Med. Wschr. 85, 1629 (1960)

4. AMELUNG, D.:
Untersuchungen zur Größe der Eliminationsgeschwindigkeit von Fermenten aus dem Kaninchen-Serum.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 318, 219 (1960)

5. ANDERSEN,V., W. GERHARDT and J. CLAUSEN:
Enzymes of human leukocytes and erythrocytes: lactic acid dehydrogenase isozymes and acid phosphatases.
In: Protides of the biological fluids, 11th Colloquium 1963. Elsevier, Amsterdam,1964.

6. APPELLA, E. and C.L. MARKERT:
Dissociation of lactate dehydrogenase into subunits with guanidine hydrochloride.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 6, 171 (1961)

7. BAILEY, J. M., J. CLOUGH and M. STEARMAN:
Clearance of plasma enzymes in normal and LDH-agent infected mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 350 (1964)

8. BERGMEYER, H. U., E. BERNT und B. HESS:
In: BERGMEYER, H. U. : Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1962.

9. BIERMAN, H. R., B. HILL, E. EMORY, L. REINHARDT, and A. SAMUELS:
Correlation of serum lactic dehydrogenase activity with the clinical status of patients with neoplastic diseases.
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 2, 5 (1955)

10. BIERMAN, H. R., B. R. HILL, L. REINHARDT and E. EMORY:
Correlation of serum lactic dehydrogenase activity with the clinical status of patients with cancer, lymphomas and leukemias.
Cancer Res. 17, 660 (1957)

11. BLANCHAER, M. C., P. T. GREEN, J. P. MACLEAN and M. J. HOLLENBERG:
Plasma lactic dehydrogenase and phosphohexose isomerase in leukemia.
Blood 13, 245 (1958)

12. BOTTOMLEY, R. H., S. J. LOCKE and H. C. INGRAM:
Zone electrophoresis of human tumor lactic dehydrogenase.
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 5, 7 (1964)

13. BOTTEMLEY, R. H., C. A. LOVIG and K. L. Evans:
Lactic dehydrogenase isozyme patterns of normal and leukemic leukocytes and plasma.
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 7, 8 (1966)

14. BOYD, J. W.:
The rates of disappearance of l-lactate dehydrogenase isoenzymes from plasma.
Biochim. Biophys. Acta 132, 221 (1967)

15. BRINDLEY, C. O. and F. L. FRANCIS:
Serum lactic dehydrogenase and glutamic-oxal-acetic transaminase correlations with measurements of tumor masses during therapy.
Cancer Res. 23, 112 (1963)

16. BÜCHER, T., E. SCHMIDT and F. SCHMIDT:
Ninth Middle East Medical Assembly, Beirut 1959.
zit. nach HESS (39)

17. CAHN, R. D., N. O. KAPLAN, L. LEVINE and E. ZWILLING:
Nature and development of lactic dehydrogenases.
Science 136, 962 (1962)

18. COHEN, L., J. DJORDJEVICH and V. ORMISTE:
Serum lactic dehydrogenase isozyme patterns in cardiovascular and other diseases with particular reference to acute myocardial infarktion.
J. Lab. Clin. Med. 64, 355 (1964)

19. CRISPENS, C. G., JR.:
A lactic dehydrogenase elevating agent in association with human neoplasmas.
Nature 199, 1202 (1963)

20. DIOGUARDI, N., A. AGOSTONI, G. FIORELLI and M. SCHWEIZER:
Characterization of lactic dehydrogenase in cells of myeloid leukemia.
Enzymol. Biol. Clin. 2, 116 (1962/63)

21. DIOGUARDI, N., A. AGOSTONI, G. FIORELLI and B. LOMANTO:
Characterization of lactic dehydrogenase of normal human granulocytes.
J. Lab. Clin. Med. 61, 713 (1963)

22. DIOGUARDI, N. und A. AGOSTONI:
Multiple Molekularformen der LDH normaler und leukämischer menschlicher Lymphozyten.
Enzymol. Biol. Clin. 5, 3 (1965)

23. Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen.
6. Aufl., J. R. Geigy A. G., Basel, 1960.

24. ENGELHARDT, A.:
Untersuchungen von Stoffwechselvorgängen an menschlichen weißen Blutzellen. I. Enzymmuster der weißen Blutzellen Gesunder.
Klin. Wschr. 42, 1141 (1964)

25. ENGELHARDT, A. und K. JAHNKE:
Untersuchungen über Stoffwechselvorgänge in menschlichen weißen Blutzellen. II. Zur Frage der Enzyminduktion bei Stoffwechseländerungen: das Enzymmuster bei Diabetes mellitus, unter verschiedenen Ernährungsbedingungen und unter dem Einfluß hormonaler Faktoren.
Klin. Wschr. 42, 1147 (1964)

26. ENGELHARDT, A. und H. GÖRLICH:
Stoffwechseluntersuchungen an menschlichen weißen Blutzellen. III. Über die Ursache des Enzymverlustes der Zellen.
Klin. Wschr. 42, 1184 (1964)

27. FLIEDNER, T. M.:
Zytokinetische Grundlagen der Wirkungen zytostatischer Substanzen.
Therapiewoche 17, 1977 (1967)

28. FRÖHLICH, C.:
Elektrophoretische Isoenzymauftrennungen der Laktatdehydrogenase im Agargel.
Z. Klin. Chem. 3, 137 (1965)

29. FRÖHLICH, C.:
Über die Analyse erhöhter Serumenzymaktivitäten der Lactatdehydrogenase bei neoplastischen Erkrankungen mit Hilfe der Isoenzymauftrennung.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 73, 844 (1967)

30. GERHARDT, W., J. CLAUSEN, E. CHRISTENSEN and J. RIISHEDE:
Lactate dehydrogenase isoenzymes in the diagnosis of human benign and malignant brain tumors.
J. Nat. Cancer Inst. 38, 343 (1967)

31. GOLDMAN, R. D. and N. O. KAPLAN:
Alteration of tissue lactate dehydrogenase in human neoplasmas.
Biochim. Biophys. Acta 77, 515 (1963)

32. GOLDMAN, R. D., N. O. KAPLAN and T. C. HALL:
Lactic dehydrogenase in human neoplastic tissue.
Cancer Res. 24, 389 (1964)

33. GRÖNVALL, C.:
On the serum activity of lactic acid dehydrogenase and phosphohexose isomerase in pernicious and hemolytic anemias.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 13, 29 (1961)

34. GÜTTLER, F.:
The metabolic activity acquired by the media of cultivated malignant and non-malignant cells compared to that of human effusions.
Enzymol. Biol. Clin. 8, 228 (1967)

35. van der HELM, H. J.:
Simple method of demonstrating lactic acid dehydrogenase isoenzymes.
Lancet 108 (1961 II)

36. van der HELM, H. J.:
A simplified method of demonstrating lactic dehydrogenase isoenzymes in serum.
Clin. Chim. Acta 7, 124 (1962)

37. HESS, B. und E. GEHM:
Über die Milchsäuredehydrogenase im menschlichen Serum.
Klin. Wschr. 33, 91 (1955)

38. HESS, B.:
DPN-dependent enzymes in serum.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 75, 292 (1958)

39. HESS, B.:
Enzyme im Blutplasma. Biochemie und Klinik.
G. Thieme, Stuttgart, 1966

40. HILL, B. R. and C. LEVI:
Elevation of a serum component in neoplastic disease.
Cancer Res. 14, 513 (1954)

41. HOLMBERG, B.:
On the in vitro release of cytoplasmic enzymes from ascites tumor cells as compared with strain L cells.
Cancer Res. 21, 1386 (1961)

42. HORN, H. D. und D. AMELUNG:
Die Bedeutung von Transaminasen- und Milchsäuredehydrogenase- Bestimmungen im Serum bei Lebererkrankungen.
Dtsch. Med. Wschr. 82, 619 (1957)

43. HSIEH, K. M. and H. T. BLUMENTHAL:
Serum lactic dehydrogenase levels in various disease states.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91, 626 (1956)

44. KAMPSCHMIDT, R. F., H. F. UPCHURCH and H. L. JOHNSON:
Plasma enzymes in tumor bearing rats.
Cancer Res. 26, 237 (1966)

45. KLEIN, U. E., H. LÖFFLER und E. LEUCKFELD:
Elektrophoretische Trennung von Milchsäuredehydrogenase-Isoenzymen, unspezifischen Esterasen und alkalischen Phospatasen aus menschlichen Blutzellen.
Klin. Wschr. 44, 637 (1966)

46. KLIMA, R., H. RETTENBACHER-DÄUBNER und H. RIEDER:
Elektrophoretische und chemische Untersuchungen bei malignen Blutkrankheiten.
Wien. Klin. Wschr. 74, 90 (1962)

47. KREUTZER, H. H. and W. H. S. FENNIS:
Lactic dehydrogenase isoenzymes in blood serum after storage at different temperatures.
Clin. Chim. Acta 9, 64 (1964)

48. KUBOWITZ, F. und P. OTT:
Isolierung und Kristallisation eines Gärungsfermentes aus Tumoren.
Biochem. Z. 314, 94 (1943)

49. LEHMANN, F. G., K. W. SCHNEIDER, G. SCHERING und V. KOCH:
Enzymelektrophorese bei internen Erkrankungen. Methodische und klinische Untersuchungen zur differentialdiagnostischen Bedeutung der elektrophoretischen Auftrennung der Lactatdehydrogenase in Isoenzyme.
Z. Vitamin. Hormon. Fermentforsch. 14, 301 (1967)

50. LEIPOLD, H., H. WÜST und H. SCHÖN:
Bedeutung und Grenzen der quantitativen Fermentdiagnostik im Serum.
Dtsch. Med. Wschr. 86, 1341 (1961)

51. LIENERT, G. A.:
Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik.
A. Hain, Meisenheim am Glan, 1962.

52. LÖHR, G. W. und H. D. WALLER:
In: Bergmeyer, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1962.

53. LÜHRS, W. und E. NEGELEIN:
Überdas Vorkommen von Milchsäuredehydrogenase im Serum krebskranker Patienten.
Klin. Wschr. 34, 148 (1956)

54. MAGILL, G. B., F. WROBLEWSKI and J. S. LADUE:
Serum lactic dehydrogenase and serum transaminase in human leukemia.
Blood 14, 870 (1959)

55. MAHEY, B. W. J., K. E. K. ROWSON and C. W. PARR:
Effect of Riley's plasma enzyme elevating virus (RV) on control of plasma enzyme levels in mice.
Biochem. J. 91, 192 (1964)

56. MAHEY, B. W. J. and K. E. K. ROWSON:
Isoenzymic specifity of impaired clearance in mice infected with Riley Virus.
Science 149, 756 (1965)

57. MARKERT, C. L.:
Lactate dehydrogenase isozymes: dissociation and recombination of subunits.
Science 140, 1329 (1963)

58. MEISTER, A.:
Reduction of alpha-gamma-diketo and alpha-keto acids catalized by muscle preparations and by crystalline lactic dehydrogenase.
J. Biol. Chem. 184, 117 (1950)

59. MERKEL, H. und H. J. SCHLEICH:
Enzymverteilungsmuster des glykolytischen Systems und Zitronensäurenzyklus im Plasma Krebskranker.
Klin. Wschr. 39, 222 (1961)

60. MOLANDER, D., F. WROBLEWSKI and J. S. LADUE:
Serum glutamic oxalacetic transaminase as an index of hepatocellular integrity.
J. Lab. Clin. Med. 46, 831 (1955)

61. MOORE, A. E. and F. WROBLEWSKI:
Lactic dehydrogenase production in tissue culture of normal, transformed and malignant human cell lines.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 782 (1958)

62. NEILANDS, J. B.:
Studies on lactic dehydrogenase of heart.
J. Biol. Chem. 199, 373 (1952)

63. NEILANDS, J. B.:
The purity of crystalline lactic dehydrogenase.
Science 115, 143 (1952)

64. NOTKINS, A. L., R. J. BERRY, J. B. MOLONEY and R. E. GREENFIELD:
Relationship of the lactic dehydrogenase factor to certain murine tumors.
Nature 193, 79 (1962)

65. NOTKINS, A. L. and C. SCHULE:
Impaired clearance of enzymes in mice infected with lactic dehydrogenase agent.
J. Nat. Cancer Inst. 33, 741 (1964)

66. PFLEIDERER, G. und D. JECKEL:
Individuelle Milchsäuredehydrogenasen bei Säugetieren.
Biochem. Z. 329, 370 (1957)

67. PFLEIDERER, G. und E. D. WACHSMUTH:
Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der Lactatdehydrogenase menschlicher Organe.
Biochem. Z. 334, 185 (1961)

68. PFLEIDERER, G. und E. D. WACHSMUTH:
Die Heterogenität der Lactatdehydrogenase in Entwicklungsgeschichte und Pathologie des Menschen.
Klin. Wschr. 39, 352 (1961)

69. PLAGEMAN, P. G. W., K. F. GREGORY and F. WROBLEWSKI:
The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase.
J. Biol. Chem. 235, 2288 (1960)

70. PLAGEMAN, P. G. W., K. F. GREGORY und F. WROBLEWSKI:
Die elektrophoretisch trennbaren Lactatdehydrogenasen des Säugetiers. III. Einfluß der Temperatur auf die Lactatdehydrogenasen des Kaninchen.
Biochem. Z. 334, 37 (1961)

71. PLASS, R. und K. D. SCHWENKE:
Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen von Isoenzymmustern in Extrakten aus Tumor- und Normalgewebe sowie im Serum des Goldhamsters.
Arch. Geschwulstforsch.28, 328 (1966)

72. POZNANSKA-LINDE, H., J. H. WILKINSON and W. A. WITHYCOMBE:
Lactate dehydrogenase isoenzymes in malignant tissues.
Nature 209, 727 (1966)

73. RAYMOND, S. and B. AURELL:
Two-dimensional gel electrophoresis.
Science 138, 152 (1962)

74. REICHARD, H.:
Ornithine carbamyl transferase in dog serum on intravenous injection of enzyme, choledochus ligation and carbon tetrachloride poisoning.
J. Lab. Clin. Med. 53, 417 (1959)

75. REMY, D.:
Fermentuntersuchungen (Milchsäuredehydrogenase) bei Blutkrankheiten.
Folia Haemat. 3, 208 (1959)

76. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry.
Symposium Series, vol. 20. Pergamon Press, Oxford, 1961

77. RICHTERICH, R. and A. BURGER:
Lactic dehydrogenase isoenzymes in human cancer cells and malignant effusions.
Enzymol. Biol. Clin. 3, 65 (1963)

78. RICHTERICH, R. and A. BURGER:
Preferential urea inactivation of electrophoretically slow migrating lactic dehydrogenase isoenzymes.
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 21, 59 (1963)

79. RILEY, V. and F. WROBLEWSKI:
Serial lactic dehydrogenase activity in plasma of mice with growing or regressing tumors.
Science 132, 151 (1960)

80. RILEY, V., F. LILLY, E. HUERTO and D. BARDELL:
Transmissible agent associated with 26 types of experimental mouse neoplasmas.
Science 132, 545 (1960)

81. SCHNEIDERBAUR, A. und F. RETTENBACHER:
Das Verhalten der Milchsüuredehydrogenase (MDH) bei Leberparenchymerkrankungen und beim Verschlußikterus.
Wien. Med. Wschr. 109, 744 (1959)

82. SCHWARTZ, M. A., M. WEST, W. S. WALSH and H. J. ZIMMERMAN:
Serum enzymes in disease. VIII. Glycolytic and oxydative enzymes and transaminases in patients with gastrointstinal carcinoma.
Cancer 15, 346 (1962)

83. STARKWEATHER, W. H. and H. K. SCHOCH:
Some observations on the lactate dehydrogenase of human neoplastic tissue.
Biochim. Biophys. Acta 62, 440 (1962)

84. STRAUB, F. B. :
Crystalline lactic dehydrogenase from heart muscle.
Biochem. J. 34, 483 (1940)

85. STREICHER, E., J. JAHNECKE, G. LÖFFLER und M. MIESCH:
Zur Differentialdiagnose der akuten Anurie.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 71, 713 (1965)

86. VESELL, E. S. and A. G. BEARN:
Localization of lactic acid dehydrogenase activity in serum fractions.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 96 (1957)

87. WACHSMUTH, E. D., G. PFLEIDERER und T. WIELAND:
Aminosäurenzusammensetzung der Lactatdehydrogenase aus menschlichen und tierischen Organen.
Biochem. Z. 340, 80 (1964)

88. WAISMAN, H. A., C. MONDER and J. N. WILLIAMS Jr.:
Glutamic acid dehydrogenase and glutamic-oxalacetic transaminase of blood in leukemia and cancer.
Cancer Res. 16, 344 (1956)

89. WAKIM, K. G. :
The fate of enzymes in body fluids.- An experimental study. IV. Relationship of the reticuloendothelial system to activities and disappearance rates of various enzymes.
J. Lab. Clin. Med. 61, 107 (1963)

90. WARBURG, O. und W. Christian:
Optischer Nachweis der Hydrierung und Dehydrierung des Pyridins im Gärungsferment.
Biochem. Z. 286, 81 (1936)

91. WEBB, E. C.:
Nomenclature of multiple enzyme forms.
Nature 203, 821 (1964)

92. WEST, M., P. HELLER and H. J. ZIMMERMAN:
Serum enzymes in disease. III. Lactic dehydrogenase and glutamic oxalacetic transaminase in patients with leukemia and lymphoma.
Amer. J. Med. Sci. 235, 689 (1958)

93. WHITE, L. P.:
Serum enzymes. II. Glycolytic enzymes in patients with cancer and other diseases.
J. Nat. Cancer Inst. 21, 671 (1958)

94. WIELAND, T. und G. PFLEIDERER:
Nachweis der Heterogenität von Milchsäuredehydrogenasen verschiedenen Ursprungs durch Trägerelektrophorese.
Biochem. Z. 329, 112 (1957)

95. WIEME, R. J. and M. RABAEY:
A new technique of quantitative ultramicro-electrophoresis.
Naturwissenschaften 44, 112 (1957)

96. WIEME, R. J.:
Application diagnostique de l'enzymo-électrophorèse des déshydrogénases de l'acide lactique.
Clin. Chim. Acta 4, 46 (1959)

97. WIEME, R. J.:
An improved technique of agar electrophoresis on microscope slides.
Clin. Chim. Acta 4, 317(1959)

98. WIEME, R. J. and Y. v. MAERCKE:
The fifth (electrophoretically slowest) serum lactic dehydrogenase as an index of liver injury.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 94, 898 (1961)

99. WIEME, R. J., M. v. SANDE, D. KARCHER, A. LOWENTHAL and H. J. van der HELM:
A modified technique for direct staining with nitroblue tetrazolium of lactate dehydrogenase iso-enzymes upon agar gel electrophoresis.
Clin. Chim. Acta 7, 750 (1962)

100. WIEME, R. J.:
Agar gel electrophoresis.
Elsevier Publishing Comp., Amsterdam/London/New York, 1965.

101. WILKINSON, J. H.:
Isoenzymes.
E. & F. N. Spon Ltd., London, 1965.

102. WITHYCOMBE, W. A., D. T. PLUMMER and J. H. WILKINSON:
Organ specifity and lactate-dehydrogenase activity.
Biochem. J. 94, 384 (1965)

103. WÖRNER, W. und H. MARTIN:
Haemolytische oder hepatogene Hyperbilirubinaemie? Ihre Abgrenzung anhand der Heterogenität der Milchsäuredehydrogenase bei hochspannungselektrophoretischer Trennung.
Klin. Wschr. 39, 368 (1961)

104. WÖRNER, W. und H. MARTIN:
Die Heterogenität der Milchsäuredehydrogenase (LDH) in den Blutzellen und das Verteilungsmuster der LDH im Serum bei Leukämien.
Proc. 8th Congress Europ. Soc. Haemat. Wien 1961, p.26

105. WRIGHT, E. J., L. P. CAWLEY and L. EBERHARDT:
Clinical application and interpretation of the serum lactic dehydrogenase zymogram.
Amer. J. Clin. Path. 45, 737 (1965)

106. WROBLEWSKI, F. and J. S. LADUE:
Serum glutamic-oxalacetic-transaminase activity as an index of liver-cell injury from cancer.
Cancer 8, 1155 (1955)

107. WROBLEWSKI, F. and J. S. LADUE:
Lactic dehydrogenase activity in blood.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90, 210 (1955)

108. WROBLEWSKI, F. and K. F. GREGORY:
Lactic dehydrogenase isozymes and their distribution in normal tissues and plasma and in disease states.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 94, 912 (1961)

109. WÜST, H., H. SCHÖN und G. BERG:
Isoenzyme der Lactatdehydrgenase (LDH) und ihre thermische Inaktivierung in der Diagnose innerer Krankheiten.
Klin. Wschr. 40, 1169 (1962)

110. WÜST, H., E. ARNOLD und H. SCHÖN:
Die thermische Inaktivierung von Serum- und Organlactatdehydrogenasen als Methode zur Isoenzymauftrennung.
Klin. Wschr. 43, 500 (1965)

111. YAFFE, D.:
The distribution and in vitro propagation of an agent causing high plasma lactic dehydrogenase activity.
Cancer Res. 22, 573 (1962)

112. ZIMMERMAN, H. J. and R. G. WEINSTEIN:
Lactic dehydrogenase in human serum.
J. Clin. Invest. 35, 748 (1956)

113. ZIMMERMANN, H. and A. G. E. PEARSE:
Limitations in the histochemical demonsration of pyridine nucleotid-linked dehydrogenases ("nothing dehydrogenase").
J. Histochem. Cytochem. 7, 271 (1959)

114. ZONDAG, H. A.:
Activity of lactate dehydrogenase in patients with malignant tumors of testis and ovary.
In: Ruyssen, R. and L. Vandendriessche: Enzymes in clinical chemistry.
Elsevier Publishing Comp., Amsterdam, 1965.

115. ZONDAG, H. A.:
Determination and diagnostic significance of lactate dehydrogenase isoenzymes.
Van Gorcum & Comp. N. V., Assen, 1967.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock danke ich für die Überlassung des Themas und für die guten Arbeitsbedingungen an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen.

Herr Dr. med. Ch. Fröhlich stand mir beratend zur Seite und brachte meinen Problemen viel Verständnis entgegen. Für die Betreuung der Arbeit bin ich ihm sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. med. R. Rietsch vom Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen danke ich für die Beratung in statistischen Fragen.

Lebenslauf

Am 20. Oktober 1943 bin ich, Eberhard Kurrle, in Biberach/Riß als Sohn des Dipl.-Kaufmannes Heinrich Kurrle geboren. Dort besuchte ich die Grundschule und das Gymnasium und legte im Jahre 1963 das Abitur ab.

Im Sommersemester 1963 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Tübingen, wo ich im Jahre 1964 die naturwissenschaftliche und im Jahre 1965 die ärztliche Vorprüfung bestand. Im Jahre 1969 beendete ich mein Medizinstudium und legte an der Universität Tübingen das Staatsexamen mit der Gesamtnote sehr gut ab.